

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 2 710 114

a nome: H. Lundbeck A/S

a: 2500 Valby - DANIMARCA

dal titolo: Produzione ad alta purezza di proteine multisubunità come gli anticorpi in microbi trasformati come la *Pichia pastoris*.

#### DESCRIZIONE

##### **CAMPO**

La presente divulgazione riguarda generalmente i metodi per la produzione di proteine eterologhe in cellule trasformate. In particolare, la presente divulgazione fornisce metodi migliorati per la produzione di proteine multisubunità, compresi gli anticorpi e altre proteine multisubunità, che possono o non possono essere secrete, con una produzione ridotta di prodotti collaterali indesiderati e/o un rendimento aumentato. In forme di realizzazione esemplari, le cellule trasformate sono un lievito, come *Pichia pastoris* o *Saccharomyces cerevisiae*.

##### **ANTEFATTO**

Gli anticorpi convenzionali sono proteine tetrameriche composte da due catene leggere identiche e due catene pesanti identiche. Anticorpi umani puri di un

tipo specifico possono essere difficili o impossibili da purificare da fonti naturali in quantità sufficienti per molti scopi. Di conseguenza, le aziende biotecnologiche e farmaceutiche si sono rivolte a metodi basati sul DNA ricombinante per preparare anticorpi su larga scala. La produzione di anticorpi funzionali generalmente coinvolge non solo la sintesi dei due polipeptidi, ma anche una serie di eventi post-traslazionali, tra cui l'elaborazione proteolitica della sequenza del segnale di secrezione N-terminale; corretto ripiegamento e assemblaggio dei polipeptidi in tetrameri; formazione di legami disolfuro; e tipicamente include una specifica glicosilazione N-legata. Tutti questi eventi hanno luogo nella via di secrezione delle cellule eucariotiche, un complesso di organelli unico nelle cellule eucariotiche. La sintesi ricombinante di tali proteine complesse si è tipicamente basata su colture di cellule eucariotiche superiori per produrre materiale biologicamente attivo, con cellule coltivate di mammiferi molto usate. Tuttavia, i sistemi di produzione basati su colture di tessuti di mammiferi comportano spese e complicazioni significative rispetto ai metodi di fermentazione microbica. Inoltre, i prodotti derivati dalla coltura di cellule di mammifero possono richie-

dere ulteriori test di sicurezza per garantire l'assenza di agenti patogeni per i mammiferi (compresi i virus) che potrebbero essere presenti nelle cellule coltivate o nei prodotti di origine animale utilizzati nella cultura, come il siero.

Il lavoro precedente ha contribuito a stabilire il lievito *Pichia pastoris* come una piattaforma economica per produrre anticorpi funzionali che sono potenzialmente adatti per la ricerca, la diagnostica e l'uso terapeutico. Si vedano i Brevetti USA 7.935.340 e 7,927,863 di co-proprietà ognuno dei quali è incorporato per riferimento nel presente documento nella sua interezza. In letteratura sono noti anche metodi per la progettazione e l'ottimizzazione delle fermentazioni di *P. pastoris* per l'espressione di proteine ricombinanti, compresa l'ottimizzazione della densità cellulare, del volume del brodo, della velocità di alimentazione del substrato e della lunghezza di ogni fase della reazione. Si vedano Zhang et al., "Rational Design and Optimization of Fed-Batch and Continuous Fermentations" in Cregg, J. M., Ed., 2007, *Pichia Protocols* (2nd edition), *Methods in Molecular Biology*, vol. 389, Humana Press, Totowa, N.J., pgs. 43-63.

Anche se le proteine ricombinanti multisubunità possono essere prodotte da cellule coltivate, possono essere prodotti anche prodotti collaterali indesiderati. Per esempio, le cellule coltivate possono produrre la proteina multisubunità desiderata insieme a monomeri liberi, complessi con stechiometria errata, o proteine con glicosilazione indesiderata o aberrante. La purificazione della proteina multisubunità desiderata può aumentare il costo di produzione, e i passaggi coinvolti nella purificazione possono diminuire la resa totale dei complessi attivi. Inoltre, anche dopo la purificazione, i prodotti collaterali indesiderati possono essere presenti in quantità tali da destare preoccupazione. Per esempio, i prodotti collaterali glicosilati possono essere presenti in quantità che aumentano il rischio di una reazione immunitaria dopo la somministrazione, mentre complessi o aggregati aberranti possono diminuire l'attività specifica e possono anche essere potenzialmente immunogeni.

WO 00/56903 A2 descrive i metodi migliorati per la produzione di proteine in *Pichia* trasformata. WO 02/48382 A2 descrive un metodo per la produzione di proteine eterologhe da un fungo. Tapani et al. (ACTA Radiologica (Stoccolma, Svezia: 1987) Nov 1996, 37:6,

923-926) describe la tossicità dell'etanolo in basse concentrazioni - valutazione sperimentale in coltura cellulare. WO 2008/063302 A2 describe nuovi promotori di *P. pastoris* No e il loro uso per dirigere l'espressione di proteine nel lievito, preferibilmente usando una strategia di accoppiamento aploide. Muhlbauer et al. (*Alcol*, vol. 24, no. 3, 1 luglio 2001, pagine 179-187) describe l'alterazione della produzione di immunoglobuline M per incubazione di cellule di ibridoma con etanolo. Baumann et al. (*Biotechnologia e bioingegneria*, 100:1, 177-183, 1 maggio 2008) describe che la coltivazione ipossica fed-batch di *Pichia pastoris* aumenta la produttività specifica e volumetrica delle proteine ricombinanti. David et al. (*The Journal of Biological Chemistry*, 25 giugno 1983, pagine 7702-7706) describe gli studi sull'effetto dell'etanolo sulla sintesi proteica eucariotica in vitro. Van de Laar et al. (*Biotechnology and Bioengineering*, 96:3, 483-494, 15 febbraio 2007) describe una maggiore produzione di proteine eterologhe da parte di *Saccharomyces cerevisiae* che cresce su etanolo come unica fonte di carbonio.

Inoltre, WO 2012/075340 A2, citabile ai sensi dell'articolo 54(3) EPC, rivela composizioni anti-NGF e il loro uso.

**SOMMARIO**

La maggior parte delle molecole di anticorpi IgG1 sono stabilizzate da un totale di 16 ponti disolfuro intra-catena e inter-catena. I ponti disolfuro intra-catena stabilizzano il ripiegamento dei domini IgG in entrambe le catene pesanti e leggere, mentre i ponti disolfuro inter-catena stabilizzano l'associazione tra catene pesanti e leggere. Come risultato di questi legami, gli anticorpi formano un complesso stabile contenente due catene pesanti e due catene leggere (H2L2). Tuttavia, a causa di una formazione impropria del legame disolfuro, nelle preparazioni di anticorpi ricombinanti si trovano a volte varianti associate al prodotto, tra cui un complesso con una catena leggera e una pesante (H1L1) e un complesso con due catene pesanti e una leggera (H2L1). Inoltre, possono formarsi anche complessi di ordine superiore in cui si formano ulteriori legami disolfuro inter-catena, con il risultato di un numero maggiore di subunità legate covalentemente.

Come descritto più avanti, i richiedenti hanno ora identificato metodi per diminuire la produzione di questi complessi contenenti legami disolfuro aberranti durante la produzione ricombinante di anticorpi da colture di lievito. In particolare, il metodo compor-

ta l'aggiunta di un bolo di etanolo alla cultura e ha portato a una diminuzione della produzione delle varianti associate ai prodotti H1L1, H2L1 e H4L4 e una maggiore purezza del prodotto H2L2 desiderato. I complessi H1L1 e H2L1 sono stati rilevati mediante SDS-PAGE denaturante non ridotta, e i complessi H4L4 sono stati rilevati mediante cromatografia di esclusione delle dimensioni. Utilizzando i metodi del soggetto, la corretta formazione del legame disolfuro è stata facilitata, con conseguente aumento della purezza dell'anticorpo. Questo è stato dimostrato per tre diversi anticorpi, tutti e tre dei quali hanno mostrato una migliore purezza quando sono stati prodotti con l'aggiunta del bolo di etanolo (FIGG. 1-6). Questi tre anticorpi non solo sono diversi nella sequenza, ma riconoscono anche tre diversi antigeni. Inoltre, quando prodotti in assenza di un bolo di etanolo, due degli anticorpi contenevano quantità maggiori del prodotto H1L1 (FIG. 1-4), rispetto al terzo anticorpo (FIG. 5). I due anticorpi che contengono quantità maggiori del prodotto H1L1 hanno un ponte disolfuro non canonico o aggiuntivo, mentre il terzo no. L'anticorpo esemplificato nelle FIGG. 1, 2 e 3 ha un ulteriore ponte disolfuro intra-catena nel dominio della catena leggera variabile, mentre l'anticorpo esem-

plificato in FIG. 4, ha un ulteriore ponte disolfuro intra-catena nella sua catena pesante. È stato riportato in letteratura che la presenza di ponti disolfuro nelle proteine sovraesprese aumenta lo stress intracellulare nell'ospite (si veda Gasser et al, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 94, N. 2, pagg. 353- 61, 5 giugno 2006 Inan et al, *Biotechnology And Bioengineering*, Vol. 93, N. 4, pagg. 771-78, 5 marzo 2006; Li et al, *Biochem Biophys Res Commun*. 19 Novembre 2010; 402(3): 519-524). Questo maggiore stress può anche portare a una minore vitalità, come è dimostrato nelle FIGG. 11, 12 e 13 dove entrambi gli anticorpi con il ponte disolfuro extra intra-catena hanno una vitalità inferiore nelle condizioni "no-bolo". L'aggiunta del bolo di etanolo porta quindi ad un aumento della vitalità e della purezza. Questo può essere utile in particolare quando si esprimono proteine difficili da esprimere con ponti disolfuro multipli.

In un aspetto, la presente invenzione fornisce un metodo di produzione di un complesso multisubunità, comprendente (a) la fornitura di una coltura comprendente cellule di *Pichia pastoris* con geni che forniscono l'espressione delle subunità di detto complesso multisubunità; (b) l'aggiunta di un bolo di etanolo a

detta coltura, che risulta in una concentrazione di etanolo in detta coltura compresa tra 0,5% e 1.5% (p/v); e (c) l'aggiunta a detta coltura di un mangime comprendente almeno una fonte di carbonio fermentabile, e la coltura di detta coltura per produrre detto complesso multisubunità, dove detto complesso multisubunità comprende un anticorpo intero o a lunghezza intera comprendente polipeptidi della catena pesante e leggera, dove detto complesso multisubunità non è un anticorpo anti-NGF contenente le sequenze polipeptidiche SEQ ID NO: 401 e SEQ ID NO: 402.

Il bolo di etanolo può migliorare la formazione di legami disolfuro stabili rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo.

Il metodo può diminuire l'abbondanza relativa di una o più varianti associate al prodotto rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo.

Il metodo può diminuire l'abbondanza relativa delle varianti associate al prodotto che hanno un peso molecolare apparente più alto o più basso di detto complesso multisubunità desiderato, come rilevato dalla cromatografia di esclusione delle dimensioni o dall'elettroforesi del gel rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo.

Il metodo può diminuire l'abbondanza relativa dei complessi con stechiometria aberrante rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo.

Il metodo può diminuire l'abbondanza relativa di complessi con legami disolfuro aberranti rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo.

Il metodo può diminuire l'abbondanza relativa di complessi con cisteine ridotte rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo.

Il metodo può diminuire l'abbondanza relativa di complessi con glicosilazione aberrante rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo.

Il metodo può modulare la formazione o la stabilità dei legami disolfuro intercatena pesante.

Il metodo può modulare la formazione o la stabilità dei legami disolfuro che collegano le catene leggere e pesanti di detto anticorpo.

Il metodo può diminuire l'abbondanza relativa di una o più varianti associate al prodotto rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo.

Tali varianti associate al prodotto possono comprendere una o più delle varianti associate al prodotto H1L1, H2L1 e H4L4.

Il metodo aumenta la purezza di detto anticorpo rispetto a detto metodo effettuato in assenza di detto bolo di etanolo.

La fase (b) può risultare in una concentrazione di etanolo in detta cultura compresa tra 0,7% e 1,5%, o tra 0,8% e 1,25%.

La fase (b) può risultare in una concentrazione di etanolo in detta cultura che può essere dello 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8% o 0,9% (p/v).

La fase (b) può risultare in una concentrazione di etanolo in detta cultura che può essere 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, o 0,5% (p/v).

La fase (b) può comprendere l'aggiunta di etanolo a detta coltura, l'aggiunta di un vettore comprendente etanolo a detta coltura, l'aggiunta di dette cellule a un mezzo o vettore comprendente etanolo, o la sostituzione di parte del mezzo di coltura.

Detto bolo di etanolo può essere aggiunto al mezzo di coltura per un periodo di tempo compreso tra 1 e 20 minuti.

La fase (c) può comprendere la fornitura di ossigeno a dette cellule.

Tale fornitura di ossigeno può comprendere l'agitazione di detta coltura.

Questo apporto di ossigeno può comprendere il contatto di detta coltura con una miscela di gas contenente ossigeno.

La fase (c) può comprendere l'aggiunta a detta coltura di un mangime comprendente una fonte di carbonio.

Detto mangime può comprendere almeno una fonte di carbonio fermentabile.

Detto mangime può comprendere uno o più di glucosio, etanolo, citrato, sorbitolo, xilosio, trealosio, arabinosio, galattosio, fruttosio, melil0,5%, lattosio, maltosio, ramnosio, ribosio, mannosio, mannitolo e raffinosio.

Il metodo può inoltre comprendere il mantenimento della concentrazione di etanolo tra un set point superiore e un set point inferiore durante la fase (c).

Detto set point inferiore può essere 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8% o 0,9% (p/v).

Detto set point superiore può essere 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, o 0,6% (p/v).

Detto set point superiore può essere al massimo 1,5%, 1,4%, 1,3, 1,2% o 1,1% (p/v).

Il metodo può inoltre comprendere il mantenimento della concentrazione di etanolo a un set point durante la fase (c).

Detto set point può essere 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 01,%, 01,1%, 01,2%, 01,3%, 01,4%, o 01,5% (p/v).

La fase (c) può comprendere il mantenimento della concentrazione di etanolo in detta cultura tra lo 0,7% e l'1,5%, o tra lo 0,8% e l'1,25%.

La concentrazione di etanolo in detta cultura può essere mantenuta controllando la produzione di etanolo da dette cellule o aggiungendo etanolo a detta cultura.

La fase di controllo della produzione di etanolo può comprendere il controllo di una o più concentrazioni di glucosio, disponibilità di ossigeno, intensità dell'agitazione, pressione del gas, portata dell'aria fornita o altra miscela di gas, viscosità della cultura, densità della cultura, concentrazione di ossigeno nell'aria fornita o altra miscela di gas e temperatura.

Il tempo tra la fase (a) e la fase (b) può essere inferiore a circa 72 ore, meno di circa 48 ore, meno di

circa 24 ore, meno di circa 12 ore, meno di circa 9 ore, meno di circa 6 ore, meno di circa 5 ore, meno di circa 4 ore, meno di circa 3 ore, meno di circa 90 minuti, meno di circa 30 minuti, meno di circa 5 minuti, o meno di circa 1 minuto.

Il tempo tra la fase (b) e la fase (c) può essere inferiore a circa 10 ore, meno di circa 9 ore, meno di circa 8 ore, meno di circa 7 ore, meno di circa 6 ore, meno di circa 5 ore, meno di circa 4 ore, meno di circa 3 ore, meno di circa 2 ore, meno di circa 90 minuti, meno di circa 80 minuti, meno di circa 70 minuti, meno di circa 60 minuti, meno di circa 50 minuti, meno di circa 40 minuti, meno di circa 30 minuti, meno di circa 20 minuti, meno di circa 10 minuti, meno di circa 5 minuti, o meno di circa 1 minuto.

La coltura della fase (a) può essere prodotta aggiungendo una fonte di carbonio a detta coltura e coltivando detta coltura fino all'esaurimento della fonte di carbonio.

Detta fonte di carbonio può comprendere uno o più di: glicerolo, glucosio, etanolo, citrato, sorbitolo, xilosio, trealosio, arabinosio, galattosio, fruttosio, melibiosio, lattosio, maltosio, ramnosio, ribosio, mannosio, mannitolo e raffiniosio.

L'esaurimento della fonte di carbonio può essere determinato rilevando una diminuzione dell'attività metabolica di dette cellule di *Pichia pastoris*.

Tale diminuzione dell'attività metabolica di dette cellule di *Pichia pastoris* può essere identificata rilevando una diminuzione del consumo di ossigeno da parte di dette cellule di *Pichia pastoris*, rilevando un aumento del pH nella coltura, rilevando la stabilizzazione della massa cellulare umida, o rilevando un aumento della concentrazione di ammoniaca nella coltura.

Tale diminuzione del consumo di ossigeno da parte di dette cellule di *Pichia pastoris* può essere identificata rilevando un aumento della concentrazione di ossigeno disciolto in detta coltura.

I geni che forniscono l'espressione di detto complesso multisubunità possono essere integrati in uno o più loci genomici.

Almeno uno di detti loci genomici può essere selezionato dal gruppo composto dal locus pGAP, 3' locus AOX TT; PpURA5; OCH1; AOX1; HIS4; GAP; pGAP; 3' AOX TT; ARG; e il locus HIS4 TT.

Almeno uno dei geni che codificano dette subunità del complesso multisubunità può essere espresso sotto il controllo di un promotore inducibile o costitutivo.

Detto promotore inducibile potrebbe essere selezionato dal gruppo composto dai promotori AOX1, CUP1, tetraciclina inducibile, tiamina inducibile e FLD1.

Almeno uno dei geni che codificano dette subunità del complesso multisubunità può essere espresso sotto il controllo di un promotore selezionato dal gruppo composto da: promotori CUP1, AOX1, ICL1, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAP), FLD1, ADH1, alcol deidrogenasi II, GAL4, PHO3, PHO5 e Pyk, promotori inducibili da tetraciclina, promotori inducibili da tiamina, promotori chimerici da essi derivati, promotori di lievito, promotori di mammiferi, promotori di insetti, promotori di piante, promotori di rettili, promotori di anfibi, promotori virali e promotori aviari.

Detta cellula *Pichia pastoris* può essere diploide, tetraploide o poliploide.

Il metodo può inoltre comprendere la purificazione di detto complesso di multisubunità da dette cellule di *Pichia pastoris* o dal mezzo di coltura.

Detto complesso multisubunità può essere purificato da un componente intracellulare, dal citoplasma, dal nucleoplasma o da una membrana di dette cellule *Pichia pastoris*.

Dette cellule di *Pichia pastoris* secernono detto complesso di multisubunità nel mezzo di coltura.

Detto complesso di multisubunità può essere purificato da detto mezzo di coltura.

Tale complesso multisubunità può comprendere un anticorpo monospecifico o bispecifico.

Tale complesso multisubunità può comprendere un anticorpo umano o un anticorpo umanizzato.

Detto anticorpo umanizzato può essere di origine di topo, ratto, coniglio, capra, pecora o mucca.

Detto anticorpo umanizzato può essere di origine di coniglio.

Tale complesso multisubunità può comprendere un anticorpo monovalente, bivalente o multivalente.

Detto anticorpo può essere purificato da detta coltura per affinità della proteina A e/o della proteina G.

Almeno uno dei geni che forniscono l'espressione di una subunità di detto complesso multisubunità in almeno una di dette cellule *Pichia pastoris* in detto pannello può essere ottimizzato per l'espressione in detta cellula eucariotica.

Detto complesso multisubunità può comprendere un anticorpo e la purezza di detto anticorpo può essere valutata misurando la frazione dell'anticorpo prodot-

to da detta cellula eucariotica che può essere contenuto in complessi di anticorpi aventi il raggio idrodinamico apparente previsto, può essere contenuto in complessi di anticorpi aventi il peso molecolare previsto, e/o lega specificamente un bersaglio di detto anticorpo.

Detto complesso multisubunità comprende un anticorpo e la resa di detto anticorpo può essere valutata determinando la quantità di anticorpo prodotto da detta cellula *Pichia pastoris* scontando qualsiasi variante associata al prodotto che può essere anormalmente glicosilata, contenuta in complessi di anticorpi diversi dai complessi aventi il raggio idrodinamico apparente previsto, contenuta in complessi di anticorpi aventi il peso molecolare previsto, e/o che non riescono a legarsi specificamente al bersaglio di detto anticorpo.

Il peso molecolare di detti complessi di anticorpi può essere determinato mediante SDS-PAGE non riducente.

Detto complesso multisubunità comprende un anticorpo, detto metodo può ulteriormente comprendere la purificazione di detto anticorpo.

Detta cellula di coltura può produrre un titolo anticorpale surnatante di almeno 100 mg/L, almeno 150

mg/L, almeno 200 mg/L, almeno 250 mg/L, almeno 300 mg/L, tra 100 e 300 mg/L, tra 100 e 500 mg/L, tra 100 e 1000 mg/L, almeno 1000 mg/L, almeno 1250 mg/litro, almeno 1500 mg/litro, almeno circa 1750 mg/litro, almeno circa 2000 mg/litro, almeno circa 10000 mg/litro, o più.

Una o più subunità di detto complesso multisubunità possono essere espresse da più di una copia del gene. Detto complesso multisubunità comprende un anticorpo che può essere espresso da 1-10 copie di un gene che codifica la catena leggera di detto anticorpo e da 1-10 copie di un gene che codifica la catena pesante di detto anticorpo.

I geni che prevedono l'espressione di detto complesso multisubunità possono essere integrati nel genoma di dette cellule.

I geni che forniscono l'espressione di detto complesso multisubunità possono essere contenuti in un elemento extracromosomico, un plasmide o un cromosoma artificiale.

Tali cellule possono comprendere più copie del gene che prevede l'espressione della catena leggera di detto anticorpo rispetto alle copie del gene che prevede l'espressione della catena pesante di detto anticorpo.

Il numero rispettivo di copie del gene che codifica la catena pesante di detto anticorpo e il numero di copie del gene che codifica la catena leggera di detto anticorpo in dette cellule può essere: 2 e 2, 2 e 3, 3 e 3, 3 e 4, 3 e 5, 4 e 3, 4 e 4, 4 e 5, 4 e 6, 5 e 4, 5 e 5, 5 e 6, o 5 e 7.

Il rispettivo numero di copie del gene che codifica la catena pesante di detto anticorpo e il numero di copie del gene che codifica la catena leggera di detto anticorpo in dette cellule può essere: 2 e 1, 3 e 1, 4 e 1, 5 e 1, 6 e 1, 7 e 1, 8 e 1, 9 e 1, 10 e 1, 1 e 2, 2 e 2, 3 e 2, 4 e 2, 5 e 2, 6 e 2, 7 e 2, 8 e 2, 9 e 2, 10 e 2, 1 e 3, 2 e 3, 3 e 3, 4 e 3, 5 e 3, 6 e 3, 7 e 3, 8 e 3, 9 e 3, 10 e 3, 1 e 4, 2 e 4, 3 e 4, 4 e 4, 5 e 4, 6 e 4, 7 e 4, 8 e 4, 9 e 4, 10 e 4, 1 e 5, 2 e 5, 3 e 5, 4 e 5, 5 e 5, 6 e 5, 7 e 5, 8 e 5, 9 e 5, 10 e 5, 1 e 6, 2 e 6, 3 e 6, 4 e 6, 5 e 6, 6 e 6, 7 e 6, 8 e 6, 9 e 6, 10 e 6, 1 e 7, 2 e 7, 3 e 7, 4 e 7, 5 e 7, 6 e 7, 7 e 7, 8 e 7, 9 e 7, 10 e 7, 1 e 8, 2 e 8, 3 e 8, 4 e 8, 5 e 8, 6 e 8, 7 e 8, 8 e 8, 9 e 8, 10 e 8, 1 e 9, 2 e 9, 3 e 9, 4 e 9, 5 e 9, 6 e 9, 7 e 9, 8 e 9, 9 e 9, 10 e 9, 1 e 10, 2 e 10, 3 e 10, 4 e 10, 5 e 10, 6 e 10, 7 e 10, 8 e 10, 9 e 10, 10 e 10.

La coltura della fase (c) può essere coltivata in un mezzo di produzione.

Detto mezzo di produzione può essere un mezzo minimo.

Detto mezzo minimo è privo di agenti selettivi.

Detto mezzo minimo manca di aminoacidi preformati o di altre biomolecole complesse.

Detto mezzo di produzione può essere un mezzo complesso.

Il mezzo complesso può comprendere uno o più estratti di lievito, peptoni di soia e altri peptoni vegetali.

La coltura della fase (c) può essere coltivata fino a un'alta densità cellulare.

Questa alta densità cellulare può essere almeno di 50 g/L.

Questa alta densità cellulare può essere almeno di 100 g/L.

Questa alta densità cellulare può essere almeno di 300 g/L.

Questa alta densità cellulare può essere almeno di 400 g/L.

Questa alta densità cellulare può essere almeno di 500 g/L.

Questa alta densità cellulare può essere almeno di 750 g/L.

Le cellule di *Pichia pastoris* possono essere coltivate per almeno 20 raddoppi e mantenere alti livelli di espressione di detto complesso multisubunità dopo aver detto almeno 20 raddoppi.

Le cellule della fase (c) possono essere coltivate per almeno 50 raddoppiamenti e mantenere alti livelli di espressione di detto complesso multisubunità dopo aver detto almeno 50 raddoppiamenti.

Le cellule della fase (c) possono essere coltivate per almeno 100 raddoppiamenti e mantenere alti livelli di espressione di detto complesso multisubunità dopo aver detto almeno 100 raddoppiamenti.

Almeno una subunità di detto complesso multisubunità può comprendere un segnale di secrezione.

Tale complesso multisubunità può comprendere un anticorpo.

Il segnale di secrezione può comprendere uno o più polipeptidi selezionati dal gruppo costituito da: SEQ ID NOs: 414 e 437, e una loro combinazione.

Detto complesso multisubunità non può essere uno qualsiasi degli anticorpi divulgati in WO2012/075340 (PCT/US11/62963, depositato il 1 dicembre 2011), US 2012/0148490 (U.S. Ser. N. 13/309,295, depositato il 1 dicembre 2011), US 2012/0141485 (U.S. Ser. N. 13/309,153, depositato il

1 dicembre 2011), US 2012/0164067 (U.S. Ser. N. 13/308,665 depositato il 1 dicembre 2011), e US 2012/0141484 (U.S. Ser. No 13/308,831, depositato il 1 dicembre, 2011).

Detto complesso multisubunità non può essere Ab1-NGF, Ab2-NGF, Ab3-NGF, Ab4-NGF, Ab5-NGF, Ab6-NGF, Ab7-NGF, Ab8-NGF, Ab9-NGF, Ab10-NGF, Ab11-NGF, Ab12-NGF, Ab13-NGF, Ab14-NGF, Ab15-NGF, Ab16-NGF, Ab17-NGF, Ab18-NGF, Ab19-NGF, Ab20-NGF, e Ab21-NGF, o un frammento Fab2 o Fab1 di questi.

Detto complesso multisubunità non può contenere almeno una, almeno due, almeno tre, almeno quattro, almeno cinque, o almeno tutte e sei le regioni determinanti la complementarità (CDR) contenute in uno dei seguenti anticorpi: Ab1-NGF, Ab2-NGF, Ab3-NGF, Ab4-NGF, Ab5-NGF, Ab6-NGF, Ab7-NGF, Ab8-NGF, Ab9-NGF, Ab10-NGF, Ab11-NGF, Ab12-NGF, Ab13-NGF, Ab14-NGF, Ab15-NGF, Ab16-NGF, Ab17-NGF, Ab18-NGF, Ab19-NGF, Ab20-NGF, o Ab21-NGF e opzionalmente con specificità di legame per NGF.

Detto complesso multisubunità può non comprendere o consistere nelle sequenze polipeptidiche della catena leggera e pesante di SEQ ID NO: 51 e 401, rispettivamente o SEQ ID NO: 53 e 402, rispettivamente o SEQ ID

NO: 405 e 406, rispettivamente, e SEQ ID NO: 407 e 408, rispettivamente.

Detto complesso multisubunità non può comprendere un anticorpo contenente almeno uno, almeno due, almeno tre, almeno quattro, almeno cinque, o almeno tutti e sei i CDR di SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59 e 60, e opzionalmente con specificità di legame per NGF.

Detto complesso multisubunità non può comprendere nessuno degli anticorpi o delle sequenze di codifica degli anticorpi qui descritte nelle sezioni intitolate "Anticorpi anti-NGF e loro frammenti di legame con attività di legame per NGF" e "Polinucleotidi che codificano polipeptidi di anticorpi anti-NGF" La presente divulgazione fornisce inoltre metodi di produzione di un complesso multisubunità, che può comprendere: coltivare una cellula ospite che fornisce una cultura che comprende cellule eucariotiche che esprime detto complesso multisubunità, aggiungendo un bolo di etanolo a detta cultura e coltivando detta cultura per produrre detto complesso multisubunità. Il complesso multisubunità può comprendere uno o più legami disolfuro e può essere un anticorpo.

Secondo la descrizione, la concentrazione del bolo di etanolo (espressa come % p/v) può essere compresa tra circa 0,1% e circa 5%, come almeno circa 0,1%, almeno

circa 0,2%, almeno circa 0,3%, almeno circa 0,4%, almeno circa 0,5%, almeno circa 0,6%, almeno circa 0,7%, almeno circa 0,8%, almeno circa 0,9%, almeno circa 1%, fino a circa 1%, fino a circa 1,1%, fino a circa 1,2%, fino a circa 1,3%, fino a circa 1,4%, fino a circa 1,5%, fino a circa 1,6%, fino a circa 1,7%, fino a circa 1,8%, fino a circa 1,9%, fino a circa 2%, fino a circa 3%, fino a circa 4%, o fino a circa 5%, come tra circa 0,1% e circa 1,9%, tra circa 0,2% e circa 1,8%, tra circa 0,3% e circa 1,7%, tra circa 0,4% e circa 1,6%, tra circa 0,5% e circa 1,5%, tra circa 0,6% e circa 1,4%, tra circa 0,7% e circa 1,3%, tra circa 0,8% e circa 1,2%, o tra circa 0,9% e circa 1,1%, come circa 0,1%, circa 0,2%, circa 0,3%, circa 0,4%, circa 0,5%, circa 0,6%, circa 0,7%, circa 0,8%, circa 0,9%, circa 1%, circa 1,1%, circa 1,2%, circa 1,3%, circa 1,4%, circa 1,5%, circa 1,6%, circa 1,7%, circa 1,8%, circa 1,9%, circa 2%, circa 2,5%, circa 3%, circa 4%, o circa 5%.

Il metodo può inoltre comprendere la purificazione di detto complesso multisubunità desiderato.

In alcuni esempi la concentrazione di etanolo può essere controllata dopo l'aggiunta del bolo di etanolo, che può essere usato per mantenere la concentrazione di etanolo a un set point desiderato o entro un in-

tervallo di set point desiderato. Il set point (espresso in % p/v) può essere compreso tra circa 0,1% e circa 4%, almeno circa 0,01%, almeno circa 0,02%, almeno circa 0,04%, almeno circa 0,06%, almeno circa 0,08%, almeno circa 0,1%, almeno circa 0,15%, almeno circa 0,2%, almeno circa 0,25%, almeno circa 0,3%, almeno circa 0,35%, almeno circa 0,4%, almeno circa 0,45%, almeno circa 0,5%, almeno circa 0,6%, almeno circa 0,7%, almeno circa 0,8%, almeno circa 0,9%, almeno circa 1%, almeno circa 1,2%, almeno circa 1,4%, almeno circa 1,6%, almeno circa 1,8%, almeno circa 2%, fino a circa 4%, fino a circa 3,75%, fino a circa 3,5%, fino a circa 3,25%, fino a circa 3%, fino a circa 2,75%, fino a circa 2,5%, fino a circa 2,25%, fino a circa 2%, fino a circa 1,75%, fino a circa 1,5%, fino a circa 1,25%, fino a circa 1%, tra circa 0,01% e circa 4%, tra circa 0,02% e circa 3,75%, tra circa 0,04% e circa 3,5%, tra circa 0,08% e circa 3,25%, tra circa 0,1% e circa 3%, tra circa 0,2% e circa 2,75%, tra circa 0,3% e circa 2,5%, tra circa 0,4% e circa 2,25%, tra circa 0,5% e circa 2%, tra circa 0,6% e circa 1,75%, tra circa 0,7% e circa 1,5%, o tra circa 0,8% e circa 1,25%. Per esempio, il set point può essere lo stesso della concentrazione del bolo o entro più o meno l'1%, 2%, 5%, 10%, 15%,

20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% della concentrazione del bolo.

Il set point della concentrazione di etanolo può essere mantenuto controllando la produzione di etanolo da parte delle cellule di lievito durante la fermentazione. Per esempio, la concentrazione di etanolo può essere aumentata aumentando la concentrazione di glucosio (per esempio, aumentando il tasso di alimentazione del glucosio), diminuendo la disponibilità di ossigeno, diminuendo l'intensità dell'agitazione (per esempio, abbassando la potenza di ingresso del fermentatore), diminuendo la pressione del gas nel fermentatore, diminuendo la portata dell'aria fornita o altra miscela di gas, aumentando la viscosità della cultura, o diminuendo la concentrazione di ossigeno nell'aria fornita o altra miscela di gas (per esempio, se viene usata un'integrazione di ossigeno). La produzione di etanolo può essere aumentata anche aumentando la temperatura di fermentazione. Allo stesso modo, la concentrazione di etanolo può essere diminuita diminuendo la concentrazione di glucosio (per esempio, diminuendo il tasso di alimentazione del glucosio), diminuita aumentando la disponibilità di ossigeno, aumentando l'intensità dell'agitazione (per esempio, aumentando la potenza di ingresso del fer-

mentatore), aumentando la pressione del gas nel fermentatore, aumentando la portata dell'aria fornita o altra miscela di gas, diminuendo la viscosità della cultura, o aumentando la concentrazione di ossigeno nell'aria fornita o altra miscela di gas (per esempio, se viene utilizzata un'integrazione di ossigeno). La produzione di etanolo può anche essere diminuita diminuendo la temperatura di fermentazione.

Usando i metodi della presente divulgazione, l'abbondanza relativa dei prodotti collaterali indesiderati può essere diminuita di almeno il 10%, almeno il 20%, almeno il 30%, almeno il 40%, almeno il 50%, almeno il 60%, almeno il 70%, almeno l'80%, almeno il 90%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99%, o fino a livelli non rilevabili rispetto ai livelli di abbondanza iniziali, rispetto ai metodi convenzionali. Esempi di prodotti collaterali indesiderati la cui abbondanza relativa può essere così diminuita possono includere una o più specie con un peso molecolare apparente diverso dal complesso multisubunità desiderato. Per esempio, il peso molecolare apparente può essere influenzato da differenze nella stechiometria, nel ripiegamento, nell'assemblaggio del complesso e/o nella glicosilazione. Per esempio, tali prodotti collaterali indesi-

derati possono essere rilevati usando la cromatografia di esclusione delle dimensioni e/o l'elettroforesi del gel, e possono avere un peso molecolare apparente più alto o più basso del complesso multisubunità desiderato. In alcuni esempi, i prodotti collaterali indesiderati possono essere rilevati in condizioni di riduzione. In altri esempi, i prodotti collaterali indesiderati possono essere rilevati in condizioni di non riduzione.

In alcuni esempi, la presente divulgazione fornisce anche metodi migliorati e composizioni di materia che forniscono la produzione ricombinante di anticorpi e altri complessi multisubunità, con una resa più elevata. In alcuni esempi, il rendimento può essere aumentato di almeno il 10%, almeno il 20%, almeno il 30%, almeno il 40%, almeno il 50%, almeno il 100%, o più (rispetto ai metodi convenzionali) utilizzando i metodi qui descritti.

In alcuni esempi, la cellula ospite in cui le proteine multisubunità possono essere prodotte può essere un lievito, per esempio in una specie *Pichia* come *P. pastoris* o un altro lievito metilotrofo, o in una specie *Saccharomyces* come *S. cerevisiae*, o un altro lievito come uno *Schizosaccharomyces* (ad esempio, *S. pombe*). Altri esempi di lievito metilotrofico che

possono essere utilizzati nella presente invenzione includono *Pichia angusta* (nota anche nell'arte come *Hansenula polymorpha*), *Pichia guillermordii*, *Pichia methanolica*, *Pichia inositovera*, *Ogataea nitrataversa* e *Candida boidnii*.

La cellula ospite può essere una cellula eucariotica, come una cellula di lievito, come un lievito metilotrofo, come un lievito del genere *Pichia*. Esempi di lieviti metilotrofi del genere *Pichia* includono *Pichia pastoris*, *Pichia angusta*, *Pichia guillermordii*, *Pichia methanolica* e *Pichia inositovera*. La cellula ospite può essere prodotta tramite accoppiamento, ad esempio accoppiando due cellule aploidi di lievito che contengono ciascuna una o più copie di almeno un gene che codifica una subunità del complesso multisubunità.

In un esempio preferito, i lieviti metilotrofi del genere *Pichia* sono *Pichia pastoris*. Una cellula ospite può essere una cellula diploide o tetraploide.

Almeno uno di detti geni che codificano dette subunità del complesso multisubunità desiderato, come detta catena leggera e/o pesante dell'anticorpo desiderato, può essere espresso sotto il controllo di un promotore inducibile o costitutivo, come CUP1 (indotto dal livello di rame nel mezzo; si veda Koller et al.,

Yeast 2000; 16: 651-656.), promotori inducibili con tetraciclina (si veda, ad es, Staib et al., Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Jan. 2008, p. 146-156), promotori inducibili di tiamina, AOX1, ICL1, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAP), FLD1, ADH1, alcol deidrogenasi II, GAL4, PHO3, PHO5, e promotori Pyk, promotori chimerici da essi derivati, promotori di lievito, promotori di mammiferi, promotori di insetti, promotori di piante, promotori di rettili, promotori di anfibi, promotori virali e promotori aviari.

La cellula ospite può secernere detto complesso multisubunità desiderato nel mezzo di coltura. In alternativa o in aggiunta, detto complesso multisubunità desiderato può essere trattenuto in detta cellula ospite e può essere isolato da essa.

Il complesso multisubunità desiderato può comprendere un anticorpo, come un anticorpo monospecifico o bispecifico. L'anticorpo può essere un anticorpo che lega specificamente un antigene.

Il complesso multisubunità desiderato può essere un anticorpo diverso da uno qualsiasi degli anticorpi (ad esempio, un anticorpo diverso da uno qualsiasi degli anticorpi anti-NGF) divulgati in WO 2012/075340 (PCT/US11/62963, depositato il 1 dicembre

2011), US 2012/0148490 (U.S. Ser. No. 13/309,295, depositato il 1 dicembre 2011), US 2012/0141485 (U.S. Ser. No. 13/309,153, depositato il 1 dicembre 2011), US 2012/0164067 (U.S. Ser. No. 13/308,665 depositato il 1 dicembre 2011), e US 2012/0141484 (U.S. Ser. No. 13/308,831, depositato il 1 aprile, 2011).

In un esempio, il complesso multisubunità desiderato può non essere uno dei seguenti anticorpi: Ab1-NGF, Ab2-NGF, Ab3-NGF, Ab4-NGF, Ab5-NGF, Ab6-NGF, Ab7-NGF, Ab8-NGF, Ab9-NGF, Ab10-NGF, Ab11-NGF, Ab12-NGF, Ab13-NGF, Ab14-NGF, Ab15-NGF, Ab16-NGF, Ab17-NGF, Ab18-NGF, Ab19-NGF, Ab20-NGF e Ab21-NGF. In un ulteriore esempio, il complesso multisubunità desiderato può non essere un frammento Fab2 di uno dei seguenti anticorpi: Ab1-NGF, Ab2-NGF, Ab3-NGF, Ab4-NGF, Ab5-NGF, Ab6-NGF, Ab7-NGF, Ab8-NGF, Ab9-NGF, Ab10-NGF, Ab11-NGF, Ab12-NGF, Ab13-NGF, Ab14-NGF, Ab15-NGF, Ab16-NGF, Ab17-NGF, Ab18-NGF, Ab19-NGF, Ab20-NGF, e Ab21-NGF. In un ulteriore esempio, il complesso multisubunità desiderato può non essere un frammento Fab1 di uno dei seguenti anticorpi: Ab1-NGF, Ab2-NGF, Ab3-NGF, Ab4-NGF, Ab5-NGF, Ab6-NGF, Ab7-NGF, Ab8-NGF, Ab9-NGF, Ab10-NGF, Ab11-NGF, Ab12-NGF, Ab13-NGF, Ab14-NGF, Ab15-NGF, Ab16-NGF, Ab17-NGF, Ab18-NGF, Ab19-NGF, Ab20-NGF, e Ab21-NGF. In un ulteriore esem-

pio, il complesso multisubunità desiderato può non comprendere un anticorpo contenente almeno una, almeno due, almeno tre, almeno quattro, almeno cinque, o almeno tutte e sei le regioni determinanti la complementarità (CDR) contenute in uno dei seguenti anticorpi: Ab1-NGF, Ab2-NGF, Ab3-NGF, Ab4-NGF, Ab5-NGF, Ab6-NGF, Ab7-NGF, Ab8-NGF, Ab9-NGF, Ab10-NGF, Ab11-NGF, Ab12-NGF, Ab13-NGF, Ab14-NGF, Ab15-NGF, Ab16-NGF, Ab17-NGF, Ab18-NGF, Ab19-NGF, Ab20-NGF, e Ab21-NGF e opzionalmente con specificità di legame per NGF. Per esempio, il complesso multisubunità desiderato può non comprendere o non essere formata dalle sequenze polipeptidiche della catena leggera e pesante, SEQ ID NO: 51 e 401, rispettivamente, e/o SEQ ID NO: 53 e 402, rispettivamente, e/o SEQ ID NO: 405 e 406, rispettivamente, e/o SEQ ID NO: 407 e 408, rispettivamente. Come ulteriore esempio, il complesso multisubunità desiderato può non comprendere un anticorpo contenente almeno uno, almeno due, almeno tre, almeno quattro, almeno cinque, o almeno tutti e sei i CDR di SEQ ID NO: 55, 56, 57, 58, 59 e 60, e opzionalmente con specificità di legame per NGF.

Il complesso multisubunità desiderato può comprendere un anticorpo di qualsiasi tipo. Tipi di anticorpi esemplari includono anticorpi di qualsiasi specie di

mammifero, ad esempio umano, topo, ratto, coniglio, capra, pecora, mucca, ecc. Preferibilmente, l'anticorpo è un anticorpo umano o un anticorpo umanizzato che può essere di origine di coniglio. L'anticorpo desiderato può essere un anticorpo monovalente, bivalente o multivalente.

Almeno uno di detti geni che prevedono l'espressione di una subunità del complesso multisubunità desiderato, come la catena leggera e/o la catena pesante di un anticorpo desiderato, in almeno una di dette cellule ospiti in detto pannello può essere ottimizzato per l'espressione in detta cellula ospite (ad esempio, selezionando i codoni preferiti e/o alterando la percentuale AT attraverso la selezione del codone).

La purezza di detto complesso multisubunità desiderato, come un anticorpo desiderato, può essere valutata misurando la frazione del complesso multisubunità desiderato prodotto da detta cellula ospite che non è glicosilato, è contenuto in complessi aventi il raggio idrodinamico apparente previsto e/o il peso molecolare apparente (ad es., misurato dalla cromatografia di esclusione delle dimensioni), ha la mobilità elettroforetica prevista (ad esempio, rilevata mediante elettroforesi su gel, come SDS-PAGE, e opzionalmente Western blotting), e/o misurando l'attività

specifica del complesso multisubunità (ad esempio, legame specifico di un bersaglio di un anticorpo desiderato).

Il complesso multisubunità desiderato può essere un anticorpo, e la resa di detto anticorpo può essere valutata determinando la quantità di anticorpo desiderato prodotto da detta cellula ospite scontando tutte le varianti associate al prodotto che sono glicosilate, contenute in complessi di anticorpi diversi dai complessi che hanno il peso molecolare apparente previsto o il raggio idrodinamico, e/o che non riescono a legarsi specificamente al bersaglio di detto anticorpo desiderato.

I metodi del soggetto possono produrre un titolo anticorpale supernatante di almeno 100 mg/L, almeno 150 mg/L, almeno 200 mg/L, almeno 250 mg/L, almeno 300 mg/L, tra 100 e 300 mg/L, tra 100 e 500 mg/L, tra 100 e 1000 mg/L o in eccesso di 1000 mg/L, ad esempio, elevato come 1200 mg/L, elevato come 10.000 mg/L, o superiore.

In un altro aspetto, la cellula ospite che produce un complesso multisubunità desiderato può essere una cellula diploide o tetraploide del genere *Pichia*, come una cellula *Pichia pastoris*. I geni che forniscono l'espressione delle subunità di detto

complesso multisubunità desiderato, come la catena leggera e la catena pesante di un anticorpo desiderato, possono essere integrati nel genoma di detta cellula ospite, e/o possono essere contenuti in un elemento extracromosomico, plasmide o cromosoma artificiale.

In un altro aspetto, la cellula ospite che produce un complesso multisubunità desiderato può essere ingegnerizzata per aumentare la resa e/o la purezza. Come descritto, la resa e la purezza di un anticorpo o di un altro complesso multisubunità possono essere notevolmente migliorate alterando il numero di copie per cellula dei geni che codificano ogni subunità. Per esempio, quando il complesso multisubunità desiderato è un anticorpo, la cellula ospite può comprendere più copie del gene che prevede l'espressione della catena leggera rispetto alle copie del gene che prevede l'espressione della catena pesante. In forme di realizzazione esemplari, la cellula ospite può comprendere da 1-10 copie di un gene che codifica la catena leggera e da 1-10 copie di un gene che codifica la catena pesante. Il rispettivo numero di copie del gene che codifica la catena pesante e il numero di copie del gene che codifica la catena leggera in detta cellula ospite può essere: 2 e 2, 2 e 3, 3 e 3, 3 e 4, 3

e 5, 4 e 3, 4 e 4, 4 e 5, 4 e 6, 5 e 4, 5 e 5, 5 e 6 o 5 e 7, rispettivamente. Ulteriori combinazioni esemplari di numeri di copie del gene della catena pesante e leggera includono qualsiasi combinazione fino a dieci copie del gene della catena pesante e/o leggera, come H2xL1, H3xL1, H4xL1, H5xL1, H6xL1, H7xL1, H8xL1, H9xL1, H10xL1, H1xL2, H2xL2, H3xL2, H4xL2, H5xL2, H6xL2, H7xL2, H8xL2, H9xL2, H10xL2, H1xL3, H2xL3, H3xL3, H4xL3, H5xL3, H6xL3, H7xL3, H8xL3, H9xL3, H10xL3, H1xL4, H2xL4, H3xL4, H4xL4, H5xL4, H6xL4, H7xL4, H8xL4, H9xL4, H10xL4, H1xL5, H2xL5, H3xL5, H4xL5, H5xL5, H6xL5, H7xL5, H8xL5, H9xL5, H10xL5, H1xL6, H2xL6, H3xL6, H4xL6, H5xL6, H6xL6, H7xL6, H8xL6, H9xL6, H10xL6, H1xL7, H2xL7, H3xL7, H4xL7, H5xL7, H6xL7, H7xL7, H8xL7, H9xL7, H10xL7, H1xL8, H2xL8, H3xL8, H4xL8, H5xL8, H6xL8, H7xL8, H8xL8, H9xL8, H10xL8, H1xL9, H2xL9, H3xL9, H4xL9, H5xL9, H6xL9, H7xL9, H8xL9, H9xL9, H10xL9, H1xL10, H2xL10, H3xL10, H4xL10, H5xL10, H6xL10, H7xL10, H8xL10, H9xL10, H10xL10, dove il numero dopo la "H" identifica il numero di copie del gene della catena pesante, e il numero dopo la "L" identifica il numero di copie del gene della catena leggera. Per esempio, il numero specificato di copie del gene della catena pesante e leggera può essere integrato in

tandem in un unico locus, o in più loci (uno o tutti i quali possono contenere più di una copia). Facoltativamente, ogni locus genomico può contenere non più di tre o quattro copie del gene integrate in tandem, promuovendo così la stabilità del numero di copie durante la propagazione e/o la produzione di anticorpi. La coltura implica tipicamente la messa in prova delle cellule con una fonte di energia, ossigeno e sostanze nutritive. In letteratura sono noti anche metodi per la progettazione e l'ottimizzazione delle fermentazioni di *P. pastoris* per l'espressione di proteine ricombinanti, compresa l'ottimizzazione della densità cellulare, del volume del brodo, della velocità di alimentazione del substrato e della lunghezza di ogni fase della reazione. *Si vedano* Zhang et al., "Rational Design and Optimization of Fed-Batch and Continuous Fermentations" in Cregg, J. M., Ed., 2007, *Pichia Protocols* (2nd edition), *Methods in Molecular Biology*, vol. 389, Humana Press, Totowa, N.J., pgs. 43-63. La coltura può essere fornita di una miscela di gas comprendente ossigeno, come l'aria con o senza integrazione di ossigeno. La coltura del lievito può essere coltivata in un mezzo di coltura che può essere un mezzo minimo, può mancare di agenti selettivi, e/o può mancare di aminoacidi preformati o

altre biomolecole complesse. Il mezzo di coltura può anche essere un mezzo complesso (per esempio, contenente estratto di lievito e/o peptone/i vegetale/i). Il mezzo può includere una fonte di azoto (ad esempio, cloruro di metilammina,  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , estratto di lievito, peptone di soia, altri peptoni vegetali, ecc.) Esempi di mezzi minimi includono minimo destrosio medio (MD) (1.34% lievito azoto base (YNB) (senza aminoacidi),  $4 \times 10^{-5}\%$  biotina, e il 2% di glucosio.), tamponato minimo glicerolo complesso medio (BMGY) (1% estratto di lievito, 2% peptone, 1% glicerolo, 1.34% YNB (senza aminoacidi),  $4 \times 10^{-5}\%$  biotina e 100 mM fosfato di potassio (pH 6.0)). I media possono includere uno o più sali (come cloruro di sodio, calcio, magnesio e fosfato), tamponi (come fosfato di potassio, Tris o HEPES), nucleosidi (come adenosina e timidina), antibiotici (ad esempio, aggiunti per inibire la crescita di contaminanti e/o per il mantenimento di un marcatore selezionabile), elementi in tracce e glucosio o un'altra fonte di energia. Eventuali integrazioni e sostituzioni possono anche essere inclusi a concentrazioni adeguate che sarebbero note a coloro esperti nella tecnica.

La coltura può essere coltivata a una densità cellulare elevata, come almeno 50 g/L, almeno 100 g/L, al-

meno 300 g/L, almeno 400 g/L, almeno 500 g/L, o almeno 700 g/L. Queste densità di coltura sono illustrative piuttosto che limitanti, e le densità di coltura adatte possono essere facilmente determinate da quelli di ordinaria abilità nell'arte.

Le cellule di lievito possono essere coltivate per almeno 20 raddoppiamenti e mantenere alti livelli di espressione di detto anticorpo dopo aver detto almeno 20 raddoppiamenti.

Le cellule di lievito possono essere coltivate per almeno 50 raddoppiamenti e mantenere alti livelli di espressione di detto anticorpo dopo aver detto almeno 50 raddoppiamenti.

Le cellule di lievito possono essere coltivate per almeno 100 raddoppiamenti e mantenere alti livelli di espressione di detto anticorpo dopo aver detto almeno 100 raddoppiamenti.

In un altro aspetto, la presente divulgazione fornisce un terreno di coltura contenente una coltura stabile di lievito diploide *Pichia* prodotta secondo uno dei metodi precedenti, dove il terreno di coltura può comprendere livelli di espressione di detto anticorpo desiderato che può essere almeno circa 50 mg/litro, 100 mg/litro, 500 mg/litro, 750 mg/litro, 1000 mg/litro, 1250 mg/litro, 1500 mg/litro, 1750

mg/litro, 2000 mg/litro, o più. Questi valori di rendimento sono illustrativi piuttosto che limitativi. Facoltativamente, il rendimento può essere ottimizzato, per esempio usando i metodi e l'approccio generale descritto in Zhang et al. (2007), *supra*. Per esempio, la resa può essere ottimizzata variando la temperatura, il pH, la composizione dei media (ad es, fonte di carbonio, concentrazione della fonte di carbonio, miscela di due o più fonti di carbonio, fonte e concentrazione di azoto, concentrazione di sali e nutrienti tra cui  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , solfato di potassio, citrato di sodio, solfato di potassio, citrato di sodio, metalli in tracce come cloruro di cobalto, solfato rameico, ioduro di sodio, solfato di manganese, molibdato di sodio, acido borico, cloruro di zinco, solfato ferroso, vitamine come biotina, inositolo, tiamina, peptone, estratto di lievito, acidi casamino, urea, fosfato di ammonio o altri ioni di ammonio, L-arginina cloridrato), tempo, densità di cultura, ossigenazione, e altri fattori che influenzano la resa. Per esempio, la resa, l'espressione e/o la purezza del complesso multisubunità desiderato può in alcuni casi essere migliorata mantenendo la temperatura ad un set point desiderato, ad esempio, un set point tra circa 15 °C e circa 30 °C, come ad esempio

tra circa 17 °C e circa 25 °C). Senza l'intenzione di essere limitati dalla teoria, si ipotizza che il controllo della temperatura può aiutare il traffico intracellulare attraverso le vie di piegatura e di elaborazione post-traslazionale, e/o può diminuire l'attività delle proteasi cellulari. Allo stesso modo, la resa, l'espressione e/o la purezza del complesso multisubunità desiderato possono in alcuni casi essere migliorate mantenendo il pH del mezzo di coltura ad un set point desiderato, per esempio, un set point tra pH 3 e pH 8, come tra pH 4 e pH 7.

In un altro aspetto, la presente divulgazione fornisce un mezzo di coltura contenente una coltura stabile di lievito diploide *Pichia pastoris* prodotta secondo uno dei metodi precedenti che esprime detto anticorpo desiderato in un mezzo di coltura in cui la densità cellulare di dette cellule diploidi in detta coltura può essere almeno circa 50 g/L, 100 g/L, 300 g/L, 400 g/L, 500 g/L, 700 g/L o più. Queste densità di coltura sono illustrative piuttosto che limitanti, e le densità di coltura adatte possono essere facilmente determinate da quelli di ordinaria abilità nell'arte.

Almeno una subunità di detto anticorpo o altra proteina multisubunità può comprendere un segnale di se-

crezione, come il peptide di segnale del lisozima S. Gallicana (CLY); CLY-L8; S. peptide di segnale cerevisiae invertasi (SUC2); MF-alfa (Prepro); MF-alfa (Pre)-apv; MF-alfa (Pre)-apvSLEKR; MF-alfa (Prepro)-(EA)3; peptide di segnale  $\alpha$ F; peptide di segnale KILM1; peptide di segnale fosfatasi acida repressa (PHO1); peptide di segnale A. niger GOX; peptide di segnale del gene di Schwanniomyces occidentalis glucoamilase (GAM1); peptide di segnale dell'albumina sierica umana (HSA) senza pro-sequenza; peptide di segnale dell'albumina sierica umana (HSA) con pro-sequenza; peptide di segnale ISN; peptide di segnale IFN; peptide di segnale HGH; fitoemagglutinina (PHA); lisozima del baco da seta; lisozima umano (LYZ1); recettore dell'attivina tipo 1; recettore dell'attivina tipo II; proteina legante dell'immunoglobulina di P. pastoris (PpBiP); leader della catena leggera dell'anticorpo umano 3D6; e qualsiasi combinazione di questi.

La cellula ospite può essere prodotta dall'accoppiamento di due cellule aploidi di lievito che contengono ciascuna una o più copie di un gene che codifica una o più subunità di detto anticorpo o altra proteina multisubunità.

#### **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

**FIG. 1A-B.** La purezza di un Ab-A prodotto in modo ricombinante è stata migliorata da un'aggiunta in bolo di etanolo prima dell'inizio dell'alimentazione con glucosio nelle colture di lievito da cui sono stati prodotti gli anticorpi. Gli anticorpi sono stati raccolti dopo 97 ore di coltura e purificati per affinità alla proteina A, poi la purezza è stata valutata mediante SDS-PAGE usando un gel non ridotto (**FIG. 1A**) per risolvere l'anticorpo completo desiderato (freccia, "Full Ab (H2L2)") dalle varianti indesiderate associate al prodotto. I complessi con stechiometria aberrante sono stati identificati in base al loro peso molecolare, all'affinità per la proteina A e agli studi aggiuntivi descritti più avanti, come una specie di "metà anticorpo" contenente una catena pesante e una leggera (freccia, "H1L1") e un complesso contenente due catene pesanti e una catena leggera ("H2L1"). L'abbondanza relativa dei complessi H2L1 e H1L1 è stata notevolmente diminuita dall'aggiunta in bolo di etanolo durante la produzione di anticorpi. Confrontare **FIG. 1A**, banda 2-3 (senza bolo) con la banda 5 (con bolo). **FIG. 1B** mostra gli stessi campioni elaborati in condizioni di riduzione, che ha separato ciascuno dei complessi anticorpo completo, H1L1 e H2L1 in singole catene pesanti e leggere, confer-

mando che i complessi H1L1 e H2L1 sono composti da catene pesanti e leggere di lunghezza completa. L'ordine delle bande in **FIG.** 1A-B: Banda 1: marker di peso molecolare; bande 2 e 3: campioni di controllo preparati da colture di fermentazione senza un'aggiunta in bolo di etanolo; banda 4: nessun campione; banda 5: campione preparato da colture di fermentazione con un'aggiunta in bolo di etanolo.

**FIGG.** 1C-E mostrano la densità della banda del gel tracciata lungo la lunghezza del gel non ridotto (**FIG.** 1A, bande 2, 3 e 5, rispettivamente); le frecce identificano i picchi corrispondenti alla specie H1L1. **FIG.** 1F tabula l'area contenuta nei picchi H1L1 mostrati in **FIGG.** 1C-E, dimostrando circa il 90% di riduzione dell'abbondanza relativa dei complessi H1L1. L'abbondanza del complesso H2L1 non è stata quantificata a causa della risoluzione incompleta dei picchi dell'anticorpo completo.

**FIGG.** 2A-B e 3A-B dimostrano la riproducibilità del miglioramento della purezza di Ab-A con un'aggiunta in bolo di etanolo alle colture di lievito. Gli anticorpi sono stati raccolti dopo 87 o 86 ore di cultura (**FIGG.** 2 e 3, rispettivamente) e purificati per affinità alla proteina A, poi la purezza è stata valutata mediante SDS-PAGE usando un gel non ridotto. L'abbon-

danza dei complessi H1L1 e H2L1 (freccie) sono stati nuovamente diminuiti dall'aggiunta in bolo di etanolo. Confrontare **FIG.** 2A, banda 3 (senza bolo) con la banda 2 (con bolo), e **FIG.** 3A, bande 4-6 (senza bolo) con le bande 2 e 4 (con bolo). **FIG.** 2B mostra gli stessi campioni di **FIG.** 2A elaborati in condizioni di riduzione, confermando ancora una volta che le varianti associate al prodotto osservato sono composte da catene pesanti e leggere di lunghezza completa. L'ordine delle bande in **FIGG.** 2A-B: Banda 1: marker di peso molecolare; banda 2: campione preparato da una cultura di fermentazione con un'aggiunta in bolo di etanolo; banda 3: campione di controllo preparato da una cultura di fermentazione senza aggiunta in bolo di etanolo. L'ordine delle bande in **FIG.** 3A: Banda 1: marker di peso molecolare; bande 2 e 4: campioni preparati da culture di fermentazione con un'aggiunta in bolo di etanolo; banda 3: nessun campione; bande 5-7: campioni di controllo preparati da culture di fermentazione senza aggiunta in bolo di etanolo.

**FIGG.** 2C e 2D mostrano la densità della banda del gel tracciata lungo la lunghezza del gel non ridotto (**FIG.** 2A, bande 2 e 3, rispettivamente); le frecce identificano i picchi corrispondenti alla specie H1L1. **FIGG.** 2E e 3B tabulano l'area contenuta nei

picchi H1L1 mostrati nelle **FIG.** 2C e **FIG.** 3A, dimostrando circa l'85% di riduzione dell'abbondanza relativa dei complessi H1L1 in **FIG.** 2A e circa l'87% di riduzione media dell'abbondanza relativa dei complessi H1L1 in **FIG.** 3A.

**La FIGG.** 4A-D. La purezza di un secondo anticorpo ricombinante ("Ab-B") è stata anche migliorata da un'aggiunta in bolo di etanolo prima della fase di produzione di un processo di fermentazione. Campioni di brodo di fermentazione sono stati raccolti dopo 67 ore ("T67") o 87 ore ("T87") di cultura (FIG. 4A-B e 4C-D, rispettivamente) e gli anticorpi sono stati purificati per affinità con la proteina A. La purezza è stata poi valutata mediante SDS-PAGE utilizzando gel non ridotti (FIGS. 4A e 4C). In entrambi i punti di tempo valutati, l'abbondanza della specie metà anticorpo (H1L1) e il complesso H2L1 è stato notevolmente diminuito nelle culture di fermentazione preparate che hanno ricevuto un'aggiunta in bolo di etanolo, rispetto alle culture di controllo che non hanno ricevuto un'aggiunta in bolo di etanolo. Confrontare **FIG.** 4A, dalle bande 2-3 (senza bolo) alle bande 6-7 (con bolo), e FIG. 4C, dalle bande 2-3 (senza bolo) alle bande 6-7 (con bolo). **FIGG.** 4B e 4D mostrano gli stessi campioni trattati in condizioni di riduzione.

L'ordine delle bande in **FIGG.** 4A-D: Banda 1: marcatore di peso molecolare; bande 2-3: campione di controllo preparato da culture di fermentazione senza aggiunta di etanolo in bolo; bande 4-5: nessun campione; bande 6-7: campioni preparati da culture di fermentazione con un'aggiunta di etanolo in bolo.

**FIGG.** 4E e 4F tabulano l'area contenuta nei picchi H1L1 mostrati nelle **FIG.** 4A (T67) e 4C (T87), rispettivamente, dimostrando che l'aggiunta del bolo di etanolo ha prodotto una riduzione del 73% circa dell'abbondanza relativa dei complessi H1L1 nel punto temporale precedente mostrato in **FIG.** 4A e circa il 34% di riduzione media dell'abbondanza relativa dei complessi H1L1 nel punto temporale successivo mostrato in **FIG.** 4C.

**FIG.** 5A-B. La purezza di un terzo anticorpo ricombinante (Ab-C) è stata anche migliorata da un'aggiunta di bolo di etanolo prima della fase di produzione della fermentazione. Gli anticorpi sono stati raccolti dopo 86 ore di coltura e purificati per affinità alla proteina A, poi la purezza è stata valutata mediante SDS-PAGE usando un gel non ridotto (FIGS. 5A). I complessi H1L1 e H2L1 erano meno abbondanti nel prodotto Ab-C anche senza l'aggiunta di un bolo di etanolo, lasciando meno spazio per il miglioramento.

Tuttavia, l'abbondanza della specie metà anticorpo (H1L1) e del complesso H2L1 era notevolmente diminuita nelle culture di fermentazione che hanno ricevuto un'aggiunta di bolo di etanolo, rispetto alle culture di controllo che non hanno ricevuto un'aggiunta in bolo di etanolo. Confrontare **FIG.** 5A, banda 5-6 (senza bolo) con la banda 3 (con bolo). **FIG.** 5B mostra gli stessi campioni trattati in condizioni di riduzione. L'ordine delle bande in **FIGG.** 5A-B: banda 1: marcatore di peso molecolare, banda 2: nessun campione; banda 3: campione preparato da culture di fermentazione che hanno ricevuto un'aggiunta in bolo di etanolo; banda 4: nessun campione; bande 5-6: campione di controllo preparato da culture di fermentazione che non hanno ricevuto un'aggiunta in bolo di etanolo.

**FIG.** 5C tabula l'area contenuta nei picchi H1L1 mostrati in **FIG.** 5A, dimostrando circa un 61% di riduzione media dell'abbondanza relativa dei complessi H1L1 con l'aggiunta in bolo di etanolo.

**FIG.** 6A-F mostra la valutazione della purezza relativa delle preparazioni Ab-A mostrate in **FIGG.** 1-3 mediante cromatografia a esclusione dimensionale. In ogni pannello, il picco principale contiene l'anticorpo completo contenente due catene pesanti e due

leggere (H2L2). La specie H1L1 non è stata risolta dal picco principale con questo metodo (si pensa che sia dovuto alla formazione di dimeri H1L1 per associazione non covalente che viene mantenuta nelle condizioni utilizzate). Tuttavia, sono state rilevate altre varianti indesiderate associate al prodotto, comprese specie di peso molecolare superiore (a sinistra del picco principale) e specie di peso molecolare inferiore (a destra del picco principale). Un picco prominente sebbene corrisponda a dimeri di anticorpi contenenti due anticorpi completi (H4L4) è stato rilevato (freccia) e l'abbondanza relativa di questi è diminuita nei campioni preparati da culture di fermentazione che hanno ricevuto un'aggiunta in bolo di etanolo. Confrontare FIGG. 6A, 6C e 6E (senza bolo) con le FIG. 6B, 6D e 6F (con bolo).

**FIG. 7** riassume la quantificazione della quantità di varianti associate al prodotto rilevate dal SEC per i sei campioni Ab-A mostrati in FIG. 6 e cinque campioni aggiuntivi. Per ogni campione identificato (col. 1), il numero di serie (col. 2, che identifica i cicli di fermentazione condotti in parallelo), il bolo aggiunto (10g/L o nessuno, col. 3) e il tempo di coltura trascorso prima che i campioni di coltura fossero prelevati ed elaborati (col. 4) sono indicati, in-

sieme alla frazione di proteine rilevata nel picco principale ("SEC Main Peak %", col. 5). L'aggiunta in bolo di etanolo alla fine della fase di crescita ha aumentato la percentuale media contenuta nel picco principale, dall'80,3% fino al 90,6%.

FIG. 8 riassume la quantificazione della quantità di varianti associate al prodotto rilevate da SEC per i campioni di anticorpi Ab-B mostrati in FIG. 4. Per ogni corsa di fermentazione (col. 1), il bolo aggiunto alla fine della fase di crescita (10g/L o nessuno, col. 2), e il tempo di coltura trascorso prima che i campioni di coltura sono stati presi e trattati (col. 3) sono mostrati, insieme alla frazione di proteine rilevate nel picco principale ("SEC Main Peak %", col. 4). La purezza complessiva è aumentata, con il picco principale che passa dal 76% al 79% a T67 e dal 60% al 73% a T87.

FIG. 9 riassume la quantificazione della quantità di varianti associate al prodotto rilevate dal SEC per i campioni di anticorpi Ab-C mostrati in FIG. 5. Per ogni corsa di fermentazione identificata (col. 1), il bolo aggiunto (10g/L o nessuno, col. 2), e il tempo di coltura trascorso prima che il campione fosse prelevato ed elaborato (col. 3) sono mostrati, insieme alla frazione di proteine rilevate nel picco princi-

pale ("SEC Main Peak %", col. 4). Esisteva poca differenza nella purezza generale come rilevato da questo metodo, con circa l'89% del prodotto contenuto nel picco principale con o senza il bolo di etanolo. Ciò era apparentemente dovuto all'elevata purezza iniziale dell'anticorpo Ab-C anche senza l'aggiunta del bolo. Inoltre, la SEC non ha risolto la specie H1L1 dall'anticorpo completo e di conseguenza la diminuzione della produzione di questa specie dovuta al bolo di etanolo non si è riflessa nei risultati della SEC.

FIG. 10 riassume i risultati della misurazione della spettrometria di massa della quantità di una catena pesante libera (priva di un legame disolfuro a una seconda catena pesante) in campioni di anticorpi Ab-A contenenti quantità elevate o basse della banda H1L1. Come previsto, la quantità di catena pesante libera era correlata alla quantità della banda H1L1, confermando la sua identità come contenente una catena pesante e una leggera e priva di un legame disolfuro a una seconda catena pesante.

FIGG. 11-13 mostrano la correlazione tra l'aggiunta di un bolo di etanolo e la vitalità delle cellule. L'aggiunta di un bolo di etanolo ha generalmente migliorato la vitalità cellulare e la purezza dell'an-

ticorpo Ab-A (FIG. 11) e l'anticorpo Ab-B (FIG. 12). Questi risultati suggeriscono che il miglioramento della vitalità cellulare può spiegare almeno in parte il miglioramento della purezza dell'anticorpo dall'aggiunta del bolo di etanolo. Coerentemente con questi risultati, la coltura di anticorpi Ab-C ha mostrato una maggiore purezza dell'anticorpo e vitalità cellulare rispetto alle colture Ab-A e Ab-B (FIG. 13). Apparentemente perché la vitalità delle culture produttrici di anticorpi Ab-C era già alta in questi esperimenti, c'era poco spazio per il miglioramento e le culture hanno mostrato un piccolo miglioramento della vitalità dall'aggiunta in bolo di etanolo. In FIGG. 11-13, le barre piene indicano nessun bolo, mentre le barre aperte indicano un'aggiunta in bolo di etanolo. La vitalità è stata determinata dalle colture di fermentazione campionate a 1,5 ore dal momento in cui i campioni sono stati raccolti per le analisi di purezza (come identificato nelle diapositive precedenti).

FIG. 14 mostra che una vasta gamma di concentrazioni di bolo di etanolo può produrre lo stesso miglioramento della purezza degli anticorpi. L'Ab-A è stato prodotto con un'aggiunta in bolo di etanolo tra 5 g/L (0,5% p/v) e 15 g/L (1,5% p/v) e purificato per affi-

nità della proteina A, quindi la purezza è stata analizzata mediante SDS-PAGE non ridotta. Ciascuna cultura ha mostrato livelli altrettanto bassi dei complessi H2L1 e H1L1 a 63 ore (FIG. 14A) e 86 ore (FIG. 14B). L'ordine delle bande in FIGG. 14A-B: banda 1: marker di peso molecolare; bande 2 e 7: 5 g/L bolo; bande 3 e 5: 10 g/L bolo; bande 4 e 6: 15 g/L in bolo.

FIG. 15 mostra che il tempo trascorso tra il picco di ossigeno disciolto e l'aggiunta del bolo di etanolo può variare considerevolmente pur dando un miglioramento simile della purezza degli anticorpi. L'Ab-A è stato prodotto con un'aggiunta in bolo di etanolo di 10 g/L (1% p/v) e purificato per affinità della proteina A, poi la purezza è stata analizzata mediante SDS-PAGE non ridotta (FIG. 15A). Il "periodo di inedia", il tempo tra il picco di ossigeno disciolto (che indica l'esaurimento della fonte di carbonio nella cultura) e l'aggiunta in bolo di etanolo, è stato variato tra 0 e 3 ore. Ogni cultura ha esibito livelli altrettanto bassi dei complessi H2L1 e H1L1 indipendentemente dalla durata del periodo di inedia, indicando che la purezza degli anticorpi è relativamente insensibile all'assenza di un periodo di inedia o di un periodo di inedia di almeno fino a tre ore.

Gli stessi campioni sono stati analizzati su un gel ridotto (FIG. 15B). L'ordine delle bande in FIGG. 15A-B: banda 1: marcatori di peso molecolare; bande 2-4: nessun campione; banda 5: 0 ore di inedia; banda 6: 3 ore di inedia.

FIG. 16 mostra l'effetto del periodo di equilibrio (il tempo tra l'aggiunta del bolo di etanolo e l'inizio dell'alimentazione) sulla purezza degli anticorpi. L'anticorpo Ab-B è stato prodotto con un'aggiunta in bolo di etanolo di 10 g/L (1% p/v) e purificato per affinità della proteina A, poi la purezza è stata analizzata mediante SDS-PAGE non ridotta (FIG. 16A). La durata del periodo di equilibrio era di 0, 30 o 60 minuti. Il periodo di equilibrio di 60 minuti ha portato a una purezza dell'anticorpo inferiore (maggiore abbondanza dei complessi H2L1 e H1L1). La vitalità della coltura era anche nettamente inferiore con un periodo di equilibrio di 60 minuti, in particolare all'inizio della coltura (a 23 ore, FIG. 16B); la vitalità era leggermente migliorata alla fine della coltura (a 85 ore, FIG. 16C). L'ordine delle bande in FIG. 16A: banda 1: marcatori di peso molecolare; bande 2 e 4: nessun campione; banda 3: 30 minuti di equilibrio; bande 5 e 6: 60 minuti di tempo di equilibrio; bande 7 e 8: 0 minuti di tempo di equilibrio.

In FIGG. 16B-C, le barre piene indicano un periodo di equilibrio di zero minuti, le barre tratteggiate indicano un periodo di equilibrio di 30 minuti e le barre aperte indicano un periodo di equilibrio di 60 minuti.

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA**

I richiedenti hanno inaspettatamente scoperto che la purezza dei complessi multisubunità espressi dal lievito può essere notevolmente migliorata dall'aggiunta di un bolo di etanolo ai mezzi di coltura. È stato dimostrato che una singola aggiunta in bolo di etanolo migliora la purezza per un periodo prolungato di produzione, fino ad almeno 97 ore.

La presente divulgazione fornisce metodi migliorati e composizioni della materia che forniscono la produzione ricombinante di anticorpi e altri complessi multisubunità con maggiore purezza e diminuita produzione di uno o più prodotti collaterali indesiderati. In alcuni esempi, rispetto al complesso multisubunità desiderato, i prodotti collaterali indesiderati possono presentare una o più delle seguenti caratteristiche: stechiometria alterata, glicosilazione aberrante, differenze nel peso molecolare apparente, differenze nei legami disolfuro, differenze nel raggio idrodinamico, frammenti e/o forme troncate di una o

più subunità. Anche i prodotti collaterali non desiderati possono presentare una o più differenze aggiuntive. I prodotti collaterali indesiderati possono anche essere rilevati dai loro effetti su una preparazione, ad esempio, alterazione del livello di attività specifica, immunogenicità, o altri effetti sulla costituzione fisica e/o la funzione del complesso multisubunità desiderato.

Per esempio, quando il complesso multisubunità desiderato è un anticorpo, i prodotti collaterali indesiderati possono includere una specie H1L1 o "metà anticorpo" (cioè, contenente una catena pesante e una catena leggera, dove la catena pesante non è legata da un legame disolfuro a un'altra catena pesante), e/o una specie H2L1 (cioè, contenente due catene pesanti e una catena leggera, ma senza una seconda catena leggera).

Pur non volendo essere limitato dalla teoria, si ipotizza che un rapido aumento della concentrazione di etanolo (che può essere portato da un'aggiunta in bolo di etanolo) può causare cambiamenti sostenuti nell'espressione genica che conferiscono un miglioramento duraturo nella produzione di complessi multisubunità correttamente ripiegati e assemblati e/o aumenta la lavorazione di complessi multisubunità im-

propriamente ripiegati o male assemblati, portando a una migliore purezza nel complesso multisubunità. Inoltre, è stato dimostrato che la purezza dell'anticorpo migliorato correlato con migliore vitalità del lievito nella cultura, e sulla base di ciò i candidati ipotizzano che la vitalità migliorata può spiegare (almeno in parte) per la purezza migliorata, anche se questa teoria non è destinato ad essere limitante.

In un esempio preferito, il complesso eterologo multisubunità è un anticorpo o un frammento di anticorpo, come un anticorpo umanizzato, composto da due subunità della catena pesante e due della catena leggera. Le cellule ospiti preferite includono lieviti, e i lieviti particolarmente preferiti includono ceppi di lievito metilotrofo, ad esempio, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*), *Pichia guillermordii*, *Pichia methanolica*, *Pichia inositovera*, e altri (si veda, ad esempio, Brevetto USA 4,812,405, 4,818,700, 4,929,555, 5,736,383, 5,955,349, 5,888,768e 6,258,559). La cellula ospite può essere prodotta con metodi noti nell'arte, come la trasformazione, l'accoppiamento, la sporulazione, ecc.

In un esempio preferito, la cellula ospite può comprendere più di una copia di uno o più dei geni che codificano le subunità proteiche eterologhe. Per

esempio, copie multiple di un gene di subunità possono essere integrate in tandem in uno o più loci cromosomici. Le copie del gene integrato in tandem sono preferibilmente mantenute in un numero stabile di copie durante la cultura per la produzione del complesso multisubunità. Per esempio, negli esempi descritti di seguito, i numeri di copie dei geni erano generalmente stabili per i ceppi di *P. pastoris* contenenti da tre a quattro copie integrate in tandem dei geni degli anticorpi della catena leggera e pesante.

Uno o più geni che codificano le subunità proteiche eterologhe sono preferibilmente integrati in uno o più loci cromosomici di una cellula ospite. Qualsiasi locus cromosomico adatto può essere utilizzato per l'integrazione, comprese le sequenze intergeniche, le sequenze promotrici, le sequenze di codifica, le sequenze di terminazione, le sequenze di regolazione, ecc. Esempi di loci cromosomici che possono essere utilizzati in *P. pastoris* includono PpURA5; *OCH1*; *AOX1*; *HIS4*; e *GAP*. I geni codificanti possono anche essere integrati in uno o più loci cromosomici casuali piuttosto che essere mirati. In forme di realizzazione preferite, i loci cromosomici sono selezionati dal gruppo composto dal locus pGAP, 3' *AOX* TT, e il locus *HIS4* TT. In ulteriori forme di

realizzazione esemplari, i geni che codificano le subunità proteiche eterologhe possono essere contenuti in uno o più elementi extracromosomici, per esempio uno o più plasmidi o cromosomi artificiali.

In alcuni esempi, la proteina multisubunità può comprendere due, tre, quattro, cinque, sei o più subunità non identiche. Inoltre, ogni subunità può essere presente una o più volte in ogni proteina multisubunità. Per esempio, la proteina multisubunità può essere un anticorpo multi-specifico come un anticorpo bi-specifico che comprende due catene leggere non identiche e due catene pesanti non identiche.

Le subunità possono essere espresse da geni monocistronici, policistronici o da qualsiasi combinazione di questi. Ogni gene policistronico può comprendere più copie della stessa subunità, o può comprendere una o più copie di ciascuna subunità diversa.

Metodi esemplari che possono essere utilizzati per la manipolazione di *Pichia pastoris* (compresi i metodi di coltura, trasformazione e accoppiamento) sono divulgati in applicazioni pubblicate tra cui U.S. 20080003643, U.S. 20070298500e U.S. 20060270045e in Higgins, D. R., e Cregg, J. M., Eds. 1998. *Pichia* Protocols. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, N.J. Cregg, J. M., Ed., 2007, *Pichia*

Protocols (2a edizione), Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, N.J.

Una cassetta di espressione esemplare che può essere utilizzata è composta dal promotore del gene della gliceraldeide deidrogenasi (gene GAP), fuso a sequenze che codificano un segnale di secrezione, seguito dalla sequenza del gene da esprimere, seguita da sequenze che codificano un segnale di terminazione trascrizionale del *P. pastoris* del gene dell'alcol ossidasi I (AOX1). Il gene marcatore di resistenza Zeocin può fornire un mezzo di arricchimento per i ceppi che contengono più copie integrate di un vettore di espressione in un ceppo selezionando i trasformanti che sono resistenti a livelli più elevati di Zeocin. Allo stesso modo, i geni marcatori di resistenza G418 o Kanamicina possono essere utilizzati per fornire un mezzo di arricchimento per i ceppi che contengono più copie integrate di un vettore di espressione in un ceppo, selezionando i trasformanti che sono resistenti a livelli più elevati di Geneticin o Kanamicina. I ceppi ospiti che possono essere utilizzati includono *P. pastoris* auxotrofico o altri ceppi di *Pichia*, per esempio, ceppi che hanno mutazioni in *met1*, *lys3*, *ura3* e *adel* o altri geni associati all'auxotrofia. Le

mutazioni preferite sono incapaci di dare origine a revertanti a qualsiasi frequenza apprezzabile e sono preferibilmente mutanti di delezione parziale o ancora più preferibilmente completa. Preferibilmente, i ceppi prototrofici diploidi o tetraploidi sono prodotti dall'accoppiamento di una serie complementare di ceppi auxotrofi.

La trasformazione di ceppi aploidi di *P. pastoris* e la manipolazione genetica del ciclo sessuale di *P. pastoris* possono essere eseguite come descritto in *Pichia Protocols* (1998, 2007), *supra*.

Prima della trasformazione, ogni vettore di espressione può essere linearizzato mediante scissione dell'enzima di restrizione all'interno di una regione omologa al locus genomico bersaglio (per esempio, la sequenza del promotore GAP) per dirigere l'integrazione dei vettori nel locus bersaglio nella cellula ospite. Campioni di ogni vettore possono quindi essere trasformati individualmente in colture dei ceppi desiderati mediante elettroporazione o altri metodi, e i trasformanti di successo possono essere selezionati per mezzo di un marcatore selezionabile, ad esempio, resistenza agli antibiotici o complementazione di un'auxotrofia. Gli isolati possono essere prelevati, sottoposti a streaking per ottenere colo-

nie singole in condizioni selettive e poi esaminati per confermare il numero di copie del gene che codifica la subunità del complesso multisubunità (ad esempio, un anticorpo desiderato) mediante Southern Blot o saggio PCR sul DNA genomico estratto da ciascun ceppo. Facoltativamente, l'espressione del prodotto genico della subunità prevista può essere confermata, ad esempio, mediante FACS, Western Blot, sollevamento di colonie e immunoblot, e altri mezzi noti nell'arte. Opzionalmente, gli isolati aploidi sono trasformati più volte per introdurre ulteriori geni eterologhi, ad esempio, copie aggiuntive della stessa subunità integrata in un locus diverso, e/o copie di una subunità diversa. I ceppi aploidi sono poi accoppiati per generare ceppi diploidi (o ceppi di ploidia superiore) in grado di sintetizzare il complesso multiproteico. La presenza di ogni gene della subunità attesa può essere confermata da Southern blotting, PCR e altri mezzi di rilevamento noti nell'arte. Quando il complesso multiproteico desiderato è un anticorpo, la sua espressione può anche essere confermata da un metodo di colony lift/immunoblot (Wung et al. Biotechniques 21 808-812 (1996) e/o da FACS.

Questo protocollo di trasformazione viene facoltativamente ripetuto per puntare un gene eterologo in un secondo locus, che può essere lo stesso gene o un gene diverso da quello che è stato puntato nel primo locus. Quando il costrutto da integrare nel secondo locus codifica una proteina uguale o molto simile alla sequenza codificata dal primo locus, la sua sequenza può essere variata per diminuire la probabilità di integrazione indesiderata nel primo locus. Per esempio, la sequenza da integrare nel secondo locus può avere differenze nella sequenza del promotore, nella sequenza di terminazione, nell'uso del codone e/o in altre differenze di sequenza tollerabili rispetto alla sequenza integrata nel primo locus.

Per accoppiare i ceppi aploidi di *P. pastoris*, ogni ceppo da incrociare può essere messo insieme su piastre di accoppiamento. Per esempio, gli accoppiamenti multipli possono essere convenientemente eseguiti allo stesso tempo strisciando ogni ceppo da accoppiare su una piastra adatta alla sua crescita, e i partner di accoppiamento possono essere strisciati su una seconda piastra (preferibilmente le piastre sono mezzi ricchi come YPD). In genere, dopo uno o due giorni di incubazione a 30° C, le cellule delle due piastre possono essere replicate in modo incrociato su una

piastra di accoppiamento, ottenendo un modello a macchie incrociate con ogni coppia di ceppi che viene co-piantata e ha l'opportunità di accoppiarsi all'intersezione di una coppia di linee di striscia originali. La piastra di accoppiamento può quindi essere incubata (ad esempio, a 30° C.) per stimolare l'inizio dell'accoppiamento tra i ceppi. Dopo circa due giorni, le cellule sulle piastre di accoppiamento possono essere strippate, rattoppate o replicate su supporti selettivi per i ceppi diploidi desiderati (ad esempio, quando i ceppi accoppiati hanno autotrofie complementari, possono essere utilizzate piastre di drop-out o di terreno minimo). Queste piastre possono essere incubate (per esempio, a 30° C.) per una durata adeguata (per esempio, circa tre giorni) per permettere la crescita selettiva dei ceppi diploidi desiderati. Le colonie che si formano possono essere prelevate e messe in strisce per ottenere colonie singole per isolare e purificare ogni ceppo diploide. I vettori di espressione per l'uso nei metodi dell'invenzione possono inoltre includere sequenze specifiche del lievito, compreso un marcatore auxotrofico o farmacologico selezionabile per identificare i ceppi di lievito trasformati. Un marcatore del farmaco può inoltre essere usato per amplificare il

numero di copie del vettore in una cellula ospite del lievito, per esempio, coltivando una popolazione di cellule in una concentrazione elevata della droga, quindi selezionando i trasformanti che esprimono livelli elevati del gene di resistenza.

In un esempio, uno o più dei geni che codificano le subunità proteiche eterologhe sono accoppiati a un promotore inducibile. I promotori esemplari adatti includono il promotore del gene dell'alcol ossidasi 1, i geni della formaldeide deidrogenasi (FLD; si veda U.S. Pub. No. 2007/0298500), e altri promotori inducibili noti nell'arte. Il promotore del gene dell'alcool ossidasi 1 è strettamente represso durante la crescita del lievito su fonti di carbonio più comuni, come glucosio, glicerolo o etanolo, ma è altamente indotto durante la crescita su metanolo (Tschopp et al., 1987 U.S. Pat. No. 4,855,231 a Stroman, D. W., et al). Per la produzione di proteine straniere, i ceppi possono essere inizialmente coltivati su una fonte di carbonio repressiva per generare biomassa e poi spostati al metanolo come unica (o principale) fonte di carbonio ed energia per indurre l'espressione del gene straniero. Un vantaggio di questo sistema di regolazione è che i ceppi di *P. pastoris* trasformati con geni stranieri i cui

prodotti di espressione sono tossici per le cellule possono essere mantenuti crescendo in condizioni di repressione.

In un altro esempio, uno o più dei geni eterologhi possono essere accoppiati a un promotore regolato, il cui livello di espressione può essere aumentato in condizioni appropriate. Esempi di promotori regolati includono il promotore CUP1 (indotto dal livello di rame nel mezzo), promotori inducibili di tetraciclina, promotori inducibili di tiamina, il promotore AOX1 e il promotore FLD1.

Anche se gran parte della presente divulgazione descrive la produzione di anticorpi, i metodi qui descritti sono facilmente adattabili anche ad altri complessi multisubunità. Senza voler essere limitati dalla teoria, si ritiene che la resa e la purezza dei complessi multisubunità possano essere notevolmente influenzati dalla concentrazione e dalla stechiometria delle subunità, che sono a loro volta influenzate dal livello di espressione dei geni responsabili della produzione di ciascuna subunità. I metodi qui descritti possono essere facilmente utilizzati per migliorare la resa e/o la purezza di qualsiasi complesso ricombinante multisubunità che comprende due o più subunità diverse. Inoltre, i metodi presenti non

sono limitati alla produzione di complessi multiproteici, ma possono anche essere facilmente adattati per l'uso con complessi di ribonucleoproteine (RNP) tra cui telomerasi, hnRNPs, ribosomi, snRNPs, particelle di riconoscimento del segnale, complessi RNase P procariotici ed eucariotici, e qualsiasi altro complesso che contiene più proteine distinte e/o subunità RNA. La cellula ospite che esprime il complesso multisubunità può essere prodotta con metodi noti nell'arte. Per esempio, un pannello di cellule di lievito diploide o tetraploide contenenti diverse combinazioni di numeri di copie di geni può essere generato accoppiando cellule contenenti un numero variabile di copie dei singoli geni di subunità (i cui numeri di copie sono preferibilmente noti prima dell'accoppiamento).

### **Definizioni**

Resta inteso che questa invenzione non si limita alla particolare metodologia, ai protocolli, alle linee cellulari, alle specie o ai generi animali e ai reagenti descritti, in quanto possono variare. Si deve anche comprendere che la terminologia usata nel presente documento ha lo scopo di descrivere solo particolari forme di realizzazione e non intende limitare

l'ambito della presente invenzione poiché sarà limitato solo dalle rivendicazioni allegate.

Come utilizzato nel presente documento, le forme singolari "un", "e" e "il, lo, la" includono riferimenti al plurale, a meno che il contenuto non indichi chiaramente altrimenti. Così, ad esempio, il riferimento a "una cellula" include una pluralità di tali cellule e il riferimento a "la proteina" include il riferimento a una o più proteine e loro equivalenti, ad esempio i polipeptidi, noti a coloro esperti nella tecnica, e così via. Salvo diversa definizione tutti i termini tecnici e scientifici usati nel presente documento hanno lo stesso significato comunemente inteso da uno di ordinaria abilità nella tecnica a cui questa divulgazione appartiene.

*Aggiunta di bolo:* Nella presente divulgazione, "aggiunta di bolo" si riferisce generalmente a un rapido cambiamento nella concentrazione di una sostanza (come l'etanolo) a contatto con le cellule coltivate (per esempio, in un mezzo di coltura). Per esempio, la sostanza può essere aggiunta alle cellule coltivate in una singola aggiunta, una successione di più di un'aggiunta, e/o infusa per un periodo di tempo (per esempio, per circa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90, o 120 minuti). La sostan-

za può anche essere aggiunta sostituendo il mezzo di coltura in parte o completamente, per esempio concentrando le cellule (usando la centrifugazione, la filtrazione, la decantazione o altri metodi), rimuovendo parte o tutto il mezzo e aggiungendo la sostanza, o aggiungendo le cellule a un mezzo contenente la sostanza. La sostanza può essere mescolata con un vettore (ad esempio, mezzi di coltura, acqua, soluzione salina, ecc.) Per esempio, un'aggiunta in bolo di etanolo può comprendere l'aggiunta di etanolo puro o concentrato (per esempio, 100%, 95%, 70%, 50%, 60%, 40%, 30%, 20%, ecc.) al mezzo di coltura in una quantità sufficiente a produrre la concentrazione desiderata. Come altro esempio, le cellule possono essere aggiunte a un mezzo contenente etanolo, per esempio, aggiungendo un inoculo contenente le cellule a un mezzo contenente etanolo.

*Concentrazione del bolo:* Nella presente divulgazione, "concentrazione del bolo" si riferisce generalmente alla concentrazione che risulta da un'aggiunta in bolo di una sostanza (ad esempio, etanolo).

*Specie di lievito competente per l'accoppiamento:* Nella presente divulgazione si intende comprendere ampiamente qualsiasi lievito diploide o tetraploide che può essere coltivato in coltura. Tali specie

di lievito possono esistere in una forma aploide, diploide o altra forma poliploide. Le cellule di una data ploidia possono, in condizioni appropriate, proliferare per un numero indefinito di generazioni in quella forma. Le cellule diploidi possono anche sporulare per formare cellule aploidi. L'accoppiamento sequenziale può portare a ceppi tetraploidi attraverso ulteriori accoppiamenti o fusioni di ceppi diploidi. La presente invenzione contempla l'uso di lievito aploide, così come cellule di lievito diploide o altre cellule di lievito poliploide prodotte, per esempio, tramite accoppiamento o fusione (per esempio, fusione di sferoplasti).

In un esempio, il lievito competente per l'accoppiamento è un membro della famiglia delle *Saccharomycetaceae*, che comprende i generi *Arxiozyma*; *Ascobotryozyma*; *Citeromyces*; *Debaryomyces*; *Dekkera*; *Eremothecium*; *Issatchenkia*; *Kazachstania*; *Kluyveromyces*; *Kodamaea*; *Lodderomyces*; *Pachysolen*; *Pi-*

*chia*; *Saccharomyces*; *Saturnispora*; *Tetrapisispora*; *Torulaspora*; *Williopsis*; e *Zygosaccharomyces*. Altri tipi di lievito potenzialmente utili nell'invenzione includono-

*Yarrowia*; *Rhodospiridium*; *Candida*; *Hansenula*; *Filo*

ba-

*sium; Sporidiobolus; Bullera; Leucosporidium e Filobasidella.*

In un esempio preferito, il lievito competente per l'accoppiamento è un membro del genere *Pichia* o è un altro metilotrofo. In un ulteriore esempio preferito, il lievito competente per l'accoppiamento del genere *Pichia* è una delle seguenti specie: *Pichiapastoris*, *Pichia methanolica*, e *Hansenula polymorpha (Pichia angusta)*. Secondo l'invenzione, il lievito competente per l'accoppiamento del genere *Pichia* è la specie *Pichia pastoris*.

*Cellula di lievito aploide:* Una cellula che ha una sola copia di ogni gene del suo normale complemento genomico (cromosomico).

*Cellula di lievito poliploide:* Una cellula che ha più di una copia del suo normale complemento genomico (cromosomico).

*Cellula di lievito diploide:* Una cellula che ha due copie (alleli) di essenzialmente ogni gene del suo normale complemento genomico, tipicamente formato dal processo di fusione (accoppiamento) di due cellule aploidi.

*Cellula di lievito tetraploide:* Una cellula che ha quattro copie (alleli) di essenzialmente ogni gene

del suo normale complemento genomico, tipicamente formato dal processo di fusione (accoppiamento) di due cellule diploidi. I tetraploidi possono portare due, tre, quattro o più cassette di espressione diverse. Tali tetraploidi potrebbero essere ottenuti in *S. cerevisiae* dall'accoppiamento selettivo di diploidi eterotallici omozigoti a/a e alfa/alfa e in *Pichia* dall'accoppiamento sequenziale di aploidi per ottenere diploidi auxotrofi. Per esempio, un aploide [met his] può essere accoppiato con un aploide [ade his] per ottenere un diploide [his]; e un aploide [met arg] può essere accoppiato con un aploide [ade arg] per ottenere un diploide [arg]; poi il diploide [his] può essere accoppiato con il diploide [arg] per ottenere un prototrofo tetraploide. Sarà compreso da coloro che sono esperti nell'arte che il riferimento ai benefici e agli usi delle cellule diploidi può essere applicato anche alle cellule tetraploidi.

*Accoppiamento del lievito:* Il processo con cui due cellule di lievito si fondono per formare un'unica cellula di lievito. Le cellule fuse possono essere cellule aploidi o cellule di ploidia superiore (per esempio, accoppiando due cellule diploidi per produrre una cellula tetraploide).

*Meiosi:* Il processo con cui una cellula di lievito diploide subisce una divisione riduttiva per formare quattro spore aploidi. Ogni spora può poi germinare e formare una linea cellulare aploide a crescita vegetativa.

*Marcatore selezionabile:* Un marcatore selezionabile è un gene o un frammento di gene che conferisce un fenotipo di crescita (caratteristica di crescita fisica) a una cellula che riceve quel gene, per esempio attraverso un evento di trasformazione. Il marcatore selezionabile permette a quella cellula di sopravvivere e crescere in un mezzo di crescita selettiva in condizioni in cui le cellule che non ricevono quel gene marcatore selezionabile non possono crescere. I geni marcatori selezionabili rientrano generalmente in diversi tipi, compresi i geni marcatori selezionabili positivi come un gene che conferisce a una cellula la resistenza a un antibiotico o altro farmaco, la temperatura quando due mutanti sensibili alla temperatura ("ts") vengono incrociati o un mutante ts viene trasformato; geni marcatori selezionabili negativi come un gene biosintetico che conferisce a una cellula la capacità di crescere in un mezzo senza un nutriente specifico necessario a tutte le cellule che non hanno quel gene biosintetico, o un gene biosinte-

tico mutagenizzato che conferisce a una cellula l'incapacità di crescere da parte delle cellule che non hanno il gene wild type; e simili. Marcatori idonei includono, ma non sono limitati a: ZEO; NEO (G418); LYS3; MET1; MET3a; ADE1; ADE3; URA3; e simili.

*Integrato:* Un elemento genetico (tipicamente un elemento genetico eterologo) che si unisce covalentemente in un cromosoma di un organismo.

*Integrato a tandem:* Due o più copie di un elemento genetico che sono integrate in posizioni adiacenti in un cromosoma. Le due o più copie non hanno necessariamente l'orientamento; ad esempio, per i geni trascritti, alcune copie possono essere trascritte dal filamento Watson e altre dal filamento Crick.

*Cellula ospite:* Nel contesto della presente divulgazione, il termine cellula ospite si riferisce a una cellula (ad esempio, una cellula eucariotica, come una cellula *Pichia*) che contiene un gene eterologo. Per esempio, il gene eterologo può fornire l'espressione di una subunità di un complesso multisubunità desiderato, un gene coinvolto nel ripiegamento delle proteine (ad esempio, un chaperone), espressione o secrezione, e/o un altro gene desiderato. Il gene eterologo può essere integrato nel genoma della cel-

lula eucariotica o contenuto in un elemento extracromosomico come un plasmide o un cromosoma artificiale.

*Vettore di espressione:* Questi vettori di DNA contengono elementi che facilitano la manipolazione per l'espressione di una proteina straniera all'interno della cellula ospite bersaglio. Convenientemente, la manipolazione delle sequenze e la produzione di DNA per la trasformazione viene prima eseguita in un ospite batterico, ad esempio *E. coli*, e di solito i vettori includono sequenze per facilitare tali manipolazioni, compresa un'origine batterica di replicazione e un marcatore di selezione batterica appropriato. I marcatori di selezione codificano proteine necessarie per la sopravvivenza o la crescita di cellule ospiti trasformate coltivate in un mezzo di coltura selettivo. Le cellule ospiti non trasformate con il vettore contenente il gene di selezione non sopravviveranno nel terreno di coltura. I geni tipici della selezione codificano proteine che (a) conferiscono resistenza agli antibiotici o ad altre tossine, (b) sono complementari di deficienze auxotrofiche o (c) forniscono nutrienti critici non disponibili da mezzi complessi. Vettori esemplari e metodi per la trasformazione del lievito sono descritti, per esempio, in Burke, D., Dawson, D., & Stearns, T. (2000).

Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

I vettori di espressione per l'uso nei metodi dell'invenzione possono inoltre includere sequenze specifiche del lievito, compreso un marcatore auxotrofico o farmacologico selezionabile per identificare i ceppi di lievito trasformati. Un marcatore di farmaco può inoltre essere usato per selezionare l'amplificazione del numero di copie del vettore in una cellula ospite del lievito.

La sequenza di codifica del polipeptide di interesse è tipicamente collegata in modo operativo alle sequenze di regolazione trascrizionale e traslazionale che prevedono l'espressione del polipeptide nelle cellule di lievito. Questi componenti del vettore possono includere, ma non sono limitati a, uno o più dei seguenti: un elemento potenziatore, un promotore e una sequenza di terminazione della trascrizione. Possono essere incluse anche sequenze per la secrezione del polipeptide, ad esempio una sequenza di segnale e simili. Un'origine di replicazione del lievito è opzionale, poiché i vettori di espressione sono spesso integrati nel genoma del lievito.

Sebbene sia opzionale, in una forma di realizzazione dell'invenzione, una o più subunità del complesso multisubunità è operativamente collegata, o fusa, a una sequenza di secrezione che prevede la secrezione del polipeptide espresso nei mezzi di coltura, che può facilitare la raccolta e la purificazione del complesso multisubunità eterologo. Ancora più preferibilmente, le sequenze di secrezione forniscono la secrezione ottimizzata del polipeptide dalle cellule ospiti (per esempio, cellule diploidi del lievito), come attraverso la selezione dei codoni preferiti e/o l'alterazione della percentuale AT attraverso la selezione dei codoni. È noto nell'arte che l'efficienza di secrezione e/o la stabilità può essere influenzata dalla scelta della sequenza di secrezione e la sequenza ottimale di secrezione può variare tra le diverse proteine (si veda, ad esempio, Koganesawa et al., *Protein Eng.* 2001 Sep;14(9):705-10. Molti segnali di secrezione potenzialmente adatti sono noti nell'arte e possono essere facilmente testati per il loro effetto sulla resa e/o la purezza di un particolare complesso eterologo di multisubunità. Qualsiasi sequenza di secrezione può essere potenzialmente utilizzata, comprese quelle presenti nelle proteine secrete dei lieviti e di altre specie, così come se-

sequenze di secrezione ingegnerizzate. Esempi di sequenze di secrezione che possono essere utilizzate includono: peptide di segnale del lisozima di pollo (CLY) (MRSLILVLCFLPLAALG (SEQ ID NO:414)), CLY-L8 (MRLLLLLLPLAALG (SEQ ID NO:415)), peptide di segnale *S. cerevisiae* invertasi (SUC2) (MLLQAFLLLAGFAAKISA (SEQ ID NO:416)), MF-alfa (Prepro) (MRFPSIFTAVLFAASSALA-APVNTTTE-EGVSLEKR (SEQ ID NO:417)), MF-alfa (Pre)-apv (MRFPSIFTAVLFAASSALA-APV (SEQ ID NO:418)), MF-alfa (Pre)-apv-SLEKR (MRFPSIFTAVLFAASSALA-APVSLEKR (SEQ ID NO:419)), MF-alfa (Prepro)-(EA)3 (MRFPSIFTAVLFAASSALA-APVNTTTE-EGVSLEKR-EAEAEA (SEQ ID NO:420)), peptide di segnale  $\alpha$ F (MRFPSIFTAVLFAASSALA-APVNTTTE-DETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVL PFSNSTNGLLFINTTIIASIAAKE-EGVSLEKR (SEQ ID NO:421)), peptide di segnale di KILM1 (MTKPTQVLVRSVSILFFITLLHLVVALNDVAGPAETAPVSLPR (SEQ ID NO:422)), peptide di segnale della fosfatasi acida repressa (PHO1) (MFSPILSLEIILALATLQSVFA (SEQ ID NO:423)), *A. niger* GOX (MQTLLVSSLVVS LAAALPHYIR (SEQ ID NO:424)), peptide di segnale *Schwanniomyces occidentalis* glucoamilasi (GAM1) (MIFLKLKISIVIGLGLVSAIQ (SEQ ID NO:425)), peptide di segnale dell'albumina del siero umano (HSA) con pro-sequenza (MKWVTFISLLFLFSSAYS RGVFRR (SEQ ID NO:426)), peptide

di segnale dell'albumina del siero umano (HSA) senza pro-sequenza (MKWVTFISLLFLFSSAYS (SEQ ID NO:427)), peptide di segnale ISN (MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAA (SEQ ID NO:428)), peptide di segnale IFN (MKYTSYILAFQLCIVLGS LGCDLP (SEQ ID NO:429)), peptide di segnale HGH (MAADSQTPWLLTFSLLCLLWPQEPGA (SEQ ID NO:430)), fitoemoagglutinina (PHA) (MKKNRMMMMIWSVGVMWMLLLVGGSYG (SEQ ID NO:431)), lisozi- ma del baco da seta (MQKLIIFALVVLCVGSEA (SEQ ID NO:432)), lisozima umano (LYZ1) (MKALIVLGLVLLSVTVQG (SEQ ID NO:433)), recettore dell'attivina tipo 1 (MVDGVMILPVLIMIALPSPS (SEQ ID NO:434)), recettore dell'attivina tipo II (MGAAAKLAFVFLISCSSG (SEQ ID NO:435)), proteina legante delle immunoglobuline P. pastoris (PpBiP) (MLSLKPSWLTLAALMYAMLLVVVFPFAKPVRA (SEQ ID NO:436)), e leader della catena leggera dell'anticorpo umano 3D6 (MDMRVPAQLLGLLLWLPGAKC (SEQ ID NO:437)). si veda Hashimoto et al., Protein Engi- neering vol. 11 no. 2 pp.75-77, 1998 Oka et al., Bio- sci Biotechnol Biochem. 1999 Nov; 63(11):1977- 83 Gellissen et al., FEMS Yeast Research 5 (2005) 1079-1096; Ma et al., Hepatology. 2005 Dec; 42(6): 1355-63; Raemaekers et al., Eur J Biochem. 1999 Oct 1;265(1):394-403; Koganesawa et al., Protein Eng. (2001) 14 (9): 705-710; Daly et al., Protein Expr Pu-

rif. 2006 Apr;46(2):456-67 Damasceno et al., Appl Microbiol Biotechnol (2007) 74:381-389e Felgenhauer et al., Nucleic Acids Res. 1990 Aug 25;18(16):4927. Il complesso multisubunità può anche essere secreto nei mezzi di coltura senza essere operativamente legato o fuso a un segnale di secrezione. Per esempio, è stato dimostrato che alcuni polipeptidi eterologhi sono secreti nei mezzi di coltura quando espressi in *P. pastoris* anche senza essere collegati o fusi a un segnale di secrezione. Inoltre, il complesso multisubunità può essere purificato dalle cellule ospiti (che, per esempio, può essere preferibile se il complesso è scarsamente secreto) utilizzando metodi noti nell'arte.

I mezzi o le cellule che comprendono un complesso multisubunità desiderato possono essere recuperati dalla coltura. Opzionalmente, le proteine secrete possono essere purificate. Per esempio, le cellule che comprendono un complesso multisubunità desiderato possono essere lisate usando metodi meccanici, chimici, enzimatici e/o osmotici (per esempio, congelamento con azoto liquido, usando un omogeneizzatore, sferificazione, sonicazione, agitazione in presenza di perline di vetro, usando detergenti, ecc.) Il complesso multisubunità desiderato può essere concentra-

to, filtrato, dializzato, ecc. Il complesso multisubunità desiderato può essere purificato in base, ad esempio, alla sua massa molecolare (ad es., cromatografia di esclusione delle dimensioni), punto isoelettrico (ad es., focalizzazione isoelettrica), mobilità elettroforetica (ad es., elettroforesi su gel), cromatografia di interazione idrofobica (ad es., HPLC), carica (ad esempio, cromatografia a scambio ionico), affinità (ad esempio, nel caso di un anticorpo, legame alla proteina A, proteina G, e/o un epitopo a cui si lega l'anticorpo desiderato), e/o stato di glicosilazione (ad esempio, rilevato dall'affinità di legame della lectina). Possono essere eseguite più fasi di purificazione per ottenere il livello di purezza desiderato. In una forma di realizzazione esemplare, il complesso multisubunità desiderato può comprendere un dominio costante dell'immunoglobulina e può essere purificato utilizzando l'affinità della proteina A o della proteina G, la cromatografia di esclusione delle dimensioni e la mancanza di legame alla lectina (per rimuovere le forme glicosilate). Opzionalmente l'inibitore della proteasi A, come il fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) può essere aggiunto per inibire la degradazione proteolitica durante la purificazione.

Gli acidi nucleici sono "operabilmente legati" quando posti in relazione funzionale con un'altra sequenza di acido nucleico. Ad esempio, il DNA per una sequenza di segnale è collegato operativamente al DNA per un polipeptide se è espresso come preproteina che partecipa alla secrezione del polipeptide; un promotore o potenziatore è collegato operativamente ad una sequenza di codifica se inglunxs la trascrizione della sequenza. In generale, "operabilmente collegate" significa che le sequenze di DNA collegate sono contigue e, nel caso di un leader della secretoria, contigue e nel frame di lettura. Tuttavia, i potenziatori non devono necessariamente essere contigui. Il collegamento può essere effettuato tramite legatura in siti di restrizione convenienti o in alternativa tramite un metodo di PCR/ricombinazione familiare a chi è esperto nell'arte (tecnologia Gateway®; Invitrogen, Carlsbad Calif.). Se tali siti non esistono, gli adattatori o i linker sintetici per oligonucleotidi possono essere utilizzati secondo la prassi convenzionale. Gli acidi nucleici desiderati (compresi gli acidi nucleici che comprendono sequenze collegate operativamente) possono anche essere prodotti tramite sintesi chimica.

I promotori sono sequenze non tradotte situate a monte (5') del codone di inizio di un gene strutturale (in genere tra 100 e 1000 bp) che controllano la trascrizione e la traduzione di particolari sequenze di acido nucleico a cui sono operativamente legate. Tali promotori rientrano in diverse classi: promotori inducibili, costitutivi e repressivi (che aumentano i livelli di trascrizione in risposta all'assenza di un repressore). I promotori induttivi possono avviare un aumento dei livelli di trascrizione dal DNA sotto il loro controllo in risposta a qualche cambiamento nelle condizioni di coltura, per esempio, la presenza o l'assenza di un nutriente o un cambiamento di temperatura.

Il frammento del promotore del lievito può anche servire come sito per la ricombinazione omologa e l'integrazione del vettore di espressione nello stesso sito nel genoma del lievito; in alternativa un marcatore selezionabile è usato come sito per la ricombinazione omologa. La trasformazione *Pichia* è descritta in Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376-3385. Esempi di promotori adatti di *Pichia* includono il CUP1 (indotto dal livello di rame nel mezzo), promotori inducibili di tetraciclina, promotori inducibili di tiamina, promotore AOX1 (Cregg et al. (1989) Mol.

Cell. Biol. 9:1316-1323); promotore ICL1 (Menendez et al. (2003) Lievito 20(13):1097-108); promotore di gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAP) (Waterham et al. (1997) Gene 186(1):37-44); e promotore FLD1 (Shen et al. (1998) Gene 216(1):93-102). Il promotore GAP è un forte promotore costitutivo e i promotori CUP1, AOX e FLD1 sono inducibili.

Altri promotori di lievito includono ADH1, alcol deidrogenasi II, GAL4, PHO3, PHO5, Pyk, e promotori chimerici derivati da questi. Inoltre, nell'invenzione possono essere utilizzati promotori non di lievito come promotori di mammiferi, insetti, piante, rettili, anfibi, virali e aviari. Più tipicamente il promotore comprenderà un promotore di mammifero (potenzialmente endogeno ai geni espressi) o comprenderà un promotore di lievito o virale che fornisce una trascrizione efficiente nei sistemi di lievito.

I polipeptidi di interesse possono essere prodotti in modo ricombinante non solo direttamente, ma anche come polipeptide di fusione con un polipeptide eterologo, per es. una sequenza di segnali o un altro polipeptide avente uno specifico sito di clivaggio al terminale N della proteina matura o polipeptide. In generale, la sequenza di segnale può essere un componente del vettore, o può essere una parte della se-

quenza di codifica del polipeptide che viene inserita nel vettore. La sequenza eterologa del segnale selezionato preferibilmente è quella che viene riconosciuta ed elaborata tramite uno dei percorsi standard disponibili nella cella ospite. Il segnale pre-pro del fattore alfa di *S. cerevisiae* si è dimostrato efficace nella secrezione di una varietà di proteine ricombinanti da *P. pastoris*. Altre sequenze di segnale del lievito includono la sequenza di segnale del fattore di accoppiamento alfa, la sequenza di segnale dell'invertasi e sequenze di segnale derivate da altri polipeptidi secreti del lievito. Inoltre, queste sequenze di peptidi di segnale possono essere ingegnerizzate per fornire una maggiore secrezione nei sistemi di espressione del lievito diploide. Altri segnali di secrezione di interesse includono anche sequenze di segnali dei mammiferi, che possono essere eterologhe alla proteina secreta, o possono essere una sequenza nativa per la proteina secreta. Le sequenze di segnale includono sequenze pre-peptidiche e in alcuni casi possono includere sequenze propeptidiche. Molte di queste sequenze di segnale sono note nell'arte, comprese le sequenze di segnale trovate sulle catene di immunoglobuline, ad esempio, la sequenza di preprotossina K28, PHA-E, FACE, MCP-1 una-

no, sequenze di segnale dell'albumina del siero umano, catena pesante Ig umana, catena leggera Ig umana, e simili. Si veda per es. Hashimoto et. al. *Protein Eng* 11(2) 75 (1998); and Kobayashi et. al. *Therapeutic Apheresis* 2(4) 257 (1998).

La trascrizione può essere aumentata inserendo una sequenza di attivatore trascrizionale nel vettore. Questi attivatori sono elementi agenti cis di DNA, solitamente lunghi da 10 a 300 bp, che agiscono su un promotore per aumentarne la trascrizione. I potenziatori trascrizionali sono relativamente indipendenti dall'orientamento e dalla posizione, essendo stati trovati 5' e 3' all'unità di trascrizione, all'interno di un introne, così come all'interno della sequenza codificante stessa. Il potenziatore può essere impiantato nel vettore in una posizione 5' o 3' alla sequenza di codifica del peptide, ma è preferibilmente situato in un sito 5' dal promotore.

I vettori di espressione usati nelle cellule ospiti eucariotiche possono anche contenere sequenze necessarie per la fine della trascrizione e per stabilizzare l'mRNA. Tali sequenze sono comunemente disponibili nelle regioni 3' al codone di terminazione traduzione, non tradotte di DNA eucariotici o virali o cDNA. Queste regioni contengono segmenti nucleotidici

trascritti come frammenti poliadenilati nella porzione non tradotta di mRNA.

La costruzione di vettori adatti contenenti uno o più dei componenti sopra elencati impiega tecniche di legatura standard o metodi di PCR/ricombinazione. I plasmidi isolati o i frammenti di DNA vengono scissi, adattati e rilegati nella forma desiderata per generare i plasmidi richiesti o tramite metodi di ricombinazione. Affinché l'analisi confermi le sequenze corrette nei plasmidi costruiti, le miscele di legatura sono utilizzati per trasformare le cellule ospiti, e trasformanti di successo selezionati da resistenza agli antibiotici (ad esempio ampicillina o Zeocin), se del caso. I plasmidi dei trasformanti vengono preparati, analizzati mediante digestione con endonucleasi di restrizione e/o sequenziati.

In alternativa alla restrizione e alla legatura dei frammenti, si possono usare metodi di ricombinazione basati su siti att ed enzimi di ricombinazione per inserire sequenze di DNA in un vettore. Questi metodi sono descritti, ad esempio, da Landy (1989) *Ann. Rev. Biochem.* 58:913-949; e sono noti a coloro esperti nella tecnica. Tali metodi utilizzano la ricombinazione intermolecolare del DNA che è mediata da una miscela di proteine di ricombinazione lambda ed E.

coli-encoded. La ricombinazione avviene tra specifici siti di attacco (att) sulle molecole di DNA che interagiscono. Per una descrizione dei siti att si veda Weisberg e Landy (1983) *Site-Specific Recombination in Phage Lambda*, in *Lambda II*, Weisberg, ed. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Press), pp. 211-250. I segmenti di DNA che fiancheggiano i siti di ricombinazione sono scambiati, in modo tale che dopo la ricombinazione, i siti att sono sequenze ibride composte da sequenze donate da ciascun vettore parentale. La ricombinazione può avvenire tra DNA di qualsiasi topologia.

I siti att possono essere introdotti in una sequenza di interesse legando la sequenza di interesse in un vettore appropriato; generando un prodotto di PCR contenente siti att B attraverso l'uso di primer specifici; generando una libreria di cDNA clonata in un vettore appropriato contenente siti att; e simili.

*Geni monocistronici e policistronici.* Un gene monocistronico codifica un RNA che contiene l'informazione genetica per tradurre una sola proteina. Un gene policistronico codifica un mRNA che contiene l'informazione genetica per tradurre più di una proteina. Le proteine codificate in un gene policistronico possono avere sequenze uguali o diverse o una loro combina-

zione. Dicistronico o bicistronico si riferisce a un gene policistronico che codifica due proteine. I geni policistronici opzionalmente includono uno o più elementi IRES (internal ribosome entry site) per facilitare l'inizio della traduzione indipendente dal cappuccio, che può essere situato in una posizione che può guidare la traduzione della regione codificante della proteina a valle indipendentemente dalla struttura 5'-cap legata all'estremità 5' della molecola di mRNA. Può essere utilizzata qualsiasi sequenza IRES nota (ad esempio, virale, eucariotica o di origine artificiale). Per esempio, la sequenza IRES del virus della paralisi del grillo nella regione intergenica (IGR) può essere usata, come descritto in Thompson et al. (2001) PNAS 98:12972-12977. Opzionalmente, la funzione IRES può essere potenziata da un'alterazione genetica, ad esempio, causando l'espressione costitutiva della chinasi eIF2 GCN2 o interrompendo due geni iniziatori tRNA(met) interrotti (id.).

Il *ripiegamento*, come usato qui, si riferisce alla struttura tridimensionale di polipeptidi e proteine, dove le interazioni tra i residui di amminoacidi agiscono per stabilizzare la struttura. Mentre le interazioni non covalenti sono importanti nel determinare la struttura, di solito le proteine di interesse

avranno legami disolfuro covalenti intra- e/o intermolecolari formati da due residui di cisteina. Per le proteine e i polipeptidi presenti in natura o i loro derivati e varianti, il corretto ripiegamento è tipicamente la disposizione che risulta in un'attività biologica ottimale, e può essere convenientemente monitorato da saggi per l'attività, ad esempio il legame del ligando, l'attività enzimatica, ecc.

In alcuni casi, per esempio quando il prodotto desiderato è di origine sintetica, i saggi basati sull'attività biologica saranno meno significativi. Il corretto ripiegamento di tali molecole può essere determinato sulla base di proprietà fisiche, considerazioni energetiche, studi di modellazione e simili. L'ospite di espressione può essere ulteriormente modificato con l'introduzione di sequenze che codificano uno o più enzimi che migliorano il ripiegamento e la formazione di legami disolfuro, cioè foldasi, chaperoning, ecc. Tali sequenze possono essere costitutivamente o inducibilmente espresse nella cellula ospite del lievito, usando vettori, marcatori, ecc. come noto nell'arte. Preferibilmente le sequenze, compresi gli elementi di regolazione trascrizionale sufficienti per il modello di espressione desiderato,

sono integrate in modo stabile nel genoma del lievito attraverso una metodologia mirata.

Per esempio, il PDI eucariotico non è solo un catalizzatore efficiente dell'ossidazione della cisteina delle proteine e dell'isomerizzazione dei legami disolfuro, ma mostra anche un'attività di chaperon. La co-espressione di PDI può facilitare la produzione di proteine attive con legami disolfuro multipli. È anche interessante l'espressione di BIP (proteina legante la catena pesante dell'immunoglobulina); ciclofilina; e simili. In una forma di realizzazione dell'invenzione, il complesso multisubunità può essere espresso da un ceppo di lievito prodotto dall'accoppiamento, dove ciascuno dei ceppi parentali aploidi esprime un enzima di ripiegamento distinto, per esempio un ceppo può esprimere BIP e l'altro ceppo può esprimere PDI o combinazioni di questi.

I termini "proteina desiderata" o "proteina bersaglio" sono usati in modo intercambiabile e si riferiscono generalmente a una proteina eterologa multisubunità come un anticorpo (ad esempio, un anticorpo umanizzato) o una porzione vincolante di esso descritto nel presente documento.

Il termine "anticorpo" comprende qualsiasi struttura molecolare contenente una catena polipeptidica con

una forma specifica che si adatta e riconosce un epitopo, dove una o più interazioni di legame non covalente stabilizzano il complesso tra la struttura molecolare e l'epitopo. L'archetipo della molecola anticorpale è l'immunoglobulina, e tutti i tipi di immunoglobuline, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, ecc., da tutte le fonti, per esempio umana, roditore, coniglio, mucca, pecora, maiale, cane, altri mammiferi, pollo, altri uccelli, ecc. sono considerati "anticorpi". Una fonte preferita per la produzione di anticorpi utili come materiale di partenza secondo l'invenzione è il coniglio. Sono state descritte numerose sequenze di codifica di anticorpi; e altre possono essere generate con metodi ben noti nell'arte. Alcuni esempi includono anticorpi chimerici, anticorpi umani e altri anticorpi di mammiferi non umani, anticorpi umanizzati, anticorpi a catena singola come scFvs, camelbodies, nano-corpi, IgNAR (anticorpi a catena singola derivati dagli squali), immunofarmaceutici piccolomodulari (SMIPs), e frammenti di anticorpi come Fabs, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e simili. Si veda Streltsov V A, et al., Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype, Protein Sci. 2005 novembre; 14(11)::2901-9. Epub 2005 Sep. 30; Greenberg A S, et al., A new antigen recep-

tor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks, *Nature*. 1995 Mar. 9; 374(6518):168-73; Nuttall S D, et al., Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries, *Mol Immunol*. 2001 Agosto; 38(4):313-26; Hamers-Casterman C, et al., Naturally occurring antibodies devoid of light chains, *Nature*. 1993 Jun. 3; 363(6428):446-8; Gill D S, et al., Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds, *Curr Opin Biotechnol*. 2006 December; 17(6):653-8. Epub 2006 Oct. 19.

Per esempio, gli anticorpi o i frammenti di legame all'antigene possono essere prodotti dall'ingegneria genetica. In questa tecnica, come in altri metodi, le cellule produttrici di anticorpi sono sensibilizzate all'antigene o immunogeno desiderato. L'RNA messaggero isolato dalle cellule che producono anticorpi è usato come modello per fare cDNA usando l'amplificazione PCR. Una libreria di vettori, ciascuno contenente un gene della catena pesante e un gene della catena leggera che mantiene la specificità dell'antigene iniziale, viene prodotta inserendo sezioni appropriate del cDNA dell'immunoglobulina amplificata nei vettori di espressione. Una libreria combinatoria

è costruita combinando la libreria dei geni della catena pesante con la libreria dei geni della catena leggera. Questo si traduce in una libreria di cloni che co-esprimono una catena pesante e una leggera (simile al frammento Fab o frammento di legame all'antigene di una molecola di anticorpo). I vettori che portano questi geni sono co-trasfettati in una cellula ospite. Quando la sintesi del gene dell'anticorpo è indotta nell'ospite trasfettato, le proteine della catena pesante e leggera si auto-assemblano per produrre anticorpi attivi che possono essere rilevati tramite screening con l'antigene o l'immunogeno.

Le sequenze di codifica degli anticorpi di interesse includono quelle codificate da sequenze native, così come gli acidi nucleici che, in virtù della degenerazione del codice genetico, non sono identici nella sequenza agli acidi nucleici divulgati, e loro varianti. I polipeptidi varianti possono includere sostituzioni, aggiunte o delezioni di aminoacidi (aa). Le sostituzioni di aminoacidi possono essere sostituzioni conservative di aminoacidi o sostituzioni per eliminare aminoacidi non essenziali, come ad esempio per alterare un sito di glicosilazione, o per minimizzare il misfolding attraverso la sostituzione o la cancellazione di uno o più residui di cisteina che

non sono necessari per la funzione. Le varianti possono essere progettate in modo da mantenere o migliorare l'attività biologica di una particolare regione della proteina (ad esempio, un dominio funzionale, residui catalitici di aminoacidi, ecc.) Le varianti includono anche frammenti dei polipeptidi qui descritti, in particolare frammenti biologicamente attivi e/o frammenti corrispondenti a domini funzionali. Le tecniche per la mutagenesi in vitro dei geni clonati sono note. Sono inclusi nell'invenzione anche i polipeptidi che sono stati modificati usando tecniche biologiche molecolari ordinarie in modo da migliorare la loro resistenza alla degradazione proteolitica o per ottimizzare le proprietà di solubilità o per renderli più adatti come agente terapeutico.

Gli anticorpi chimerici possono essere realizzati con mezzi ricombinanti combinando le regioni delle catene leggere e pesanti variabili (VL e VH), ottenute da cellule produttrici di anticorpi di una specie con le regioni delle catene leggere e pesanti costanti di un'altra. Tipicamente gli anticorpi chimerici utilizzano regioni variabili di roditori o conigli e regioni costanti umane, al fine di produrre un anticorpo con domini prevalentemente umani. La produzione di tali anticorpi chimerici è ben nota nell'arte, e può

essere ottenuta con mezzi standard (come descritto, ad esempio, in, U.S. Pat. No. 5,624,659). È inoltre contemplato che le regioni costanti umane degli anticorpi chimerici dell'invenzione possono essere selezionate dalle regioni costanti IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Gli anticorpi umanizzati sono ingegnerizzati per contenere domini immunoglobulinici ancora più simili a quelli umani, e incorporano solo le regioni che determinano la complementarità dell'anticorpo di derivazione animale. Questo viene realizzato esaminando attentamente la sequenza degli anelli iper-variabili delle regioni variabili dell'anticorpo monoclonale, e adattandoli alla struttura delle catene anticorpali umane. Anche se apparentemente complesso, il processo è semplice nella pratica. Si veda, per es., U.S. Pat. N. 6,187,287. I metodi di umanizzazione degli anticorpi sono stati descritti in precedenza in, U.S. Patent No. 7935340. In alcuni casi, è necessario determinare se sono necessari ulteriori residui di struttura di coniglio per mantenere l'attività. In alcuni casi gli anticorpi umanizzati richiedono ancora alcuni residui critici della struttura del coniglio da mantenere per minimizzare la perdita di affinità o attività. In questi casi, è necessario cambiare ami-

noacidi singoli o multipli della struttura dalle sequenze germinali umane agli aminoacidi originali del coniglio per avere l'attività desiderata. Questi cambiamenti sono determinati sperimentalmente per identificare quali residui di coniglio sono necessari per preservare l'affinità e l'attività.

Oltre alle immunoglobuline intere (o alle loro controparti ricombinanti), possono essere sintetizzati frammenti di immunoglobuline che comprendono il sito di legame dell'epitopo (ad esempio, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, o altri frammenti). "Frammento" o immunoglobuline minime possono essere progettate utilizzando tecniche di immunoglobuline ricombinanti. Per esempio, le immunoglobuline "Fv" da usare nella presente invenzione possono essere prodotte sintetizzando una regione di catena leggera variabile fusa e una regione di catena pesante variabile. Anche le combinazioni di anticorpi sono interessanti, ad esempio i diacorpi, che comprendono due distinte specificità Fv. In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, gli SMIP (immunofarmaci a piccole molecole), i camelbody, i nanocorpi e gli IgNAR sono compresi nei frammenti di immunoglobuline.

Le immunoglobuline e i loro frammenti possono essere modificati post-translazionalmente, ad esempio per

aggiungere società effettrici come leganti chimici, società rilevabili, come coloranti fluorescenti, enzimi, tossine, substrati, materiali bioluminescenti, materiali radioattivi, società chemiluminescenti e simili, o società di legame specifiche, come streptavidina, avidina, o biotina, e simili possono essere utilizzati nei metodi e composizioni della presente invenzione. Esempi di molecole effettrici aggiuntive sono forniti infra.

*Variante associata al prodotto:* un prodotto diverso dal prodotto desiderato (ad esempio, il complesso multisubunità desiderato) che è presente in una preparazione del prodotto desiderato e collegato al prodotto desiderato. Esempi di varianti associate al prodotto includono peptidi troncati o allungati, prodotti con glicosilazione diversa dalla glicosilazione desiderata (ad esempio, se si desidera un prodotto aglicosilato, allora qualsiasi prodotto glicosilato sarebbe considerato una variante associata al prodotto), complessi con stechiometria anomala, assemblaggio improprio, collegamenti disolfuro anomali, ripiegamento anomalo o incompleto, aggregazione, scissione da proteasi o altre anomalie. Le varianti esemplari associate al prodotto possono presentare alterazioni in uno o più della massa molecolare (ad es. rilevata

dalla cromatografia di esclusione delle dimensioni), del punto isoelettrico (ad es. rilevato dalla focalizzazione isoelettrica), della mobilità elettroforetica (ad es. rilevata dall'elettroforesi del gel), dello stato di fosforilazione (ad es. rilevato dalla spettrometria di massa), del rapporto tra carica e massa (ad es. rilevato dalla spettrometria di massa), della massa o dell'identità dei frammenti proteolitici (ad es, rilevato mediante spettrometria di massa o elettroforesi su gel), idrofobicità (ad es. rilevata mediante HPLC), carica (ad es. rilevata mediante cromatografia a scambio ionico), affinità (ad es. nel caso di un anticorpo, rilevata mediante legame alla proteina A, alla proteina G e/o a un epitopo a cui si lega l'anticorpo desiderato) e stato di glicosilazione (ad es. rilevato mediante affinità di legame alla lectina). Quando la proteina desiderata è un anticorpo, il termine variante prodotto-associato può includere una variante glico-pesante e/o specie di metà anticorpo (descritta di seguito).

Esempi di varianti associate al prodotto includono forme varianti che contengono legami disolfuro aberranti. Per esempio, la maggior parte delle molecole di anticorpi IgG1 sono stabilizzate da un totale di 16 ponti disolfuro intra-catena e inter-catena, che

stabilizzano il ripiegamento dei domini IgG in entrambe le catene pesanti e leggere, mentre i ponti disolfuro inter-catena stabilizzano l'associazione tra catene pesanti e leggere. Anche altri tipi di anticorpi contengono legami disolfuro intra-catena e inter-catena caratteristici e stabilizzanti. Inoltre, alcuni anticorpi (compresi Ab-A e Ab-B divulgati nel presente documento) contengono ulteriori legami disolfuro indicati come legami disolfuro non canonici. Così, legami disolfuro intercatena aberranti possono risultare in una stechiometria anomala del complesso, a causa dell'assenza di un legame covalente stabilizzante, e/o legami disolfuro a subunità aggiuntive. Inoltre, i legami disolfuro aberranti (sia intercatena che intra-catena) possono diminuire la stabilità strutturale dell'anticorpo, che può risultare in una minore attività, una minore stabilità, una maggiore propensione a formare aggregati e/o una maggiore immunogenicità. Le varianti associate al prodotto che contengono legami disolfuro aberranti possono essere rilevate in una varietà di modi, tra cui SDS-PAGE denaturante non ridotto, elettroforesi capillare, cIEX, spettrometria di massa (opzionalmente con modifica chimica per produrre uno spostamento di massa nelle cisteine libere), cromatografia di esclusio-

ne delle dimensioni, HPLC, variazioni della dispersione della luce e qualsiasi altro metodo adatto noto nell'arte. *Si veda, per esempio, The Protein Protocols Handbook 2002, Part V, 581-583, DOI: 10.1385/1-59259-169-8:581;*

*metà anticorpo, specie di metà anticorpo o H1L1* si riferiscono a un complesso proteico che include una singola catena anticorpale pesante e una singola catena anticorpale leggera, ma manca un legame covalente con una seconda catena anticorpale pesante e leggera. Due metà anticorpi possono rimanere associati in modo non covalente in alcune condizioni (il che può dare un comportamento simile a quello di un anticorpo completo, ad esempio il peso molecolare apparente determinato dalla cromatografia di esclusione delle dimensioni). Allo stesso modo, *H2L1* si riferisce a un complesso proteico che include due catene di anticorpi pesanti e una singola catena di anticorpi leggeri, ma manca un legame covalente con una seconda catena di anticorpi leggeri; questi complessi possono anche associarsi non covalentemente con un'altra catena di anticorpi leggeri (e allo stesso modo danno un comportamento simile a un anticorpo completo). Come gli anticorpi completi, le specie di metà anticorpo e le specie *H2L1* possono dissociarsi in condizioni

di riduzione in catene pesanti e leggere individuali. Le specie di metà anticorpo e H2L1 possono essere rilevate su un gel SDS-PAGE non ridotto come una specie che migra ad un peso molecolare apparente inferiore rispetto all'anticorpo completo, ad esempio, H1L1 migra a circa la metà del peso molecolare apparente dell'anticorpo completo (ad esempio, circa 75 kDa).

La variante *glico-pesante* si riferisce a una variante associata al prodotto glicosilato talvolta presente nelle preparazioni di anticorpi e che contiene almeno una sequenza Fc parziale. La variante glico-pesante è caratterizzata da una diminuita mobilità elettroforetica osservabile tramite SDS-PAGE (rispetto a una catena pesante normale), affinità di legame con la lectina, legame con un anticorpo anti-Fc e apparente maggiore peso molecolare dei complessi anticorpali contenenti la variante glico-pesante come determinato dalla cromatografia a esclusione dimensionale. See U.S. Provisional Application Ser. No. 61/525,307 (Atty. Docket No. 67858.730200), depositato il 31 agosto, 2011.

Il termine "lievito poliploide che esprime stabilmente o esprime un polipeptide eterologo secreto desiderato per un tempo prolungato" si riferisce a una coltura di lievito che secerne detto polipeptide per al-

meno alcuni giorni fino a una settimana, più preferibilmente almeno un mese, ancora più preferibilmente almeno 1-6 mesi, e ancora più preferibilmente per più di un anno a livelli di espressione soglia, tipicamente almeno 50-500 mg/litro (dopo circa 90 ore in cultura) e preferibilmente sostanzialmente maggiore.

Il termine "coltura di lievito poliploidale che secerne quantità desiderate di polipeptide ricombinante" si riferisce a colture che secernono stabilmente o per periodi prolungati almeno 50-500 mg/litro, e preferibilmente 500-1000 mg/litro o più.

Una sequenza polinucleotidica "corrisponde" a una sequenza polipeptidica se la traduzione della sequenza polinucleotidica secondo il codice genetico produce la sequenza polipeptidica (cioè, la sequenza polinucleotidica "codifica" la sequenza polipeptidica), una sequenza polinucleotidica "corrisponde" a un'altra sequenza polinucleotidica se le due sequenze codificano la stessa sequenza polipeptidica.

Una regione o un dominio "eterologo" di un costrutto di DNA è un segmento identificabile di DNA all'interno di una molecola di DNA più grande che non si trova in associazione con la molecola più grande in natura. Così, quando la regione eterologa codifica un gene dei mammiferi, il gene sarà solitamente affiancato da

DNA che non affianca il DNA genomico dei mammiferi nel genoma dell'organismo di origine. Un altro esempio di una regione eterologa è un costrutto in cui la sequenza codificante stessa non si trova in natura (ad esempio, un cDNA in cui la sequenza codificante genomica contiene introni, o sequenze sintetiche con codoni diversi dal gene nativo). Le variazioni alleliche o gli eventi mutazionali che si verificano naturalmente non danno origine a una regione eterologa di DNA come definita nel presente documento.

Una "sequenza codificante" è una sequenza in-frame di codoni che (alla luce del codice genetico) corrisponde o codifica una sequenza proteica o peptidica. Due sequenze codificanti si corrispondono se le sequenze o le loro sequenze complementari codificano le stesse sequenze di amminoacidi. Una sequenza codificante in associazione con sequenze di regolazione appropriate può essere trascritta e tradotta in un polipeptide. Un segnale di poliadenilazione e una sequenza di terminazione della trascrizione si trovano solitamente a 3' della sequenza codificante. Una "sequenza promotrice" è una regione di regolazione del DNA capace di legare la RNA polimerasi in una cellula e di iniziare la trascrizione di una sequenza codificante a valle (direzione 3'). Le sequenze promotrici contengono ti-

picamente siti aggiuntivi per il legame di molecole regolatrici (per esempio, fattori di trascrizione) che influenzano la trascrizione della sequenza codificante. Una sequenza codificante è "sotto il controllo" della sequenza promotrice o "operativamente legata" al promotore quando la RNA polimerasi lega la sequenza promotrice in una cellula e trascrive la sequenza codificante in mRNA, che viene poi a sua volta tradotta nella proteina codificata dalla sequenza codificante.

I vettori sono utilizzati per introdurre una sostanza estranea, come il DNA, l'RNA o la proteina, in un organismo o in una cellula ospite. I vettori tipici includono virus ricombinanti (per i polinucleotidi) e liposomi (per i polipeptidi). Un "vettore DNA" è un replicone, come plasmide, fago o cosmide, al quale potrebbe essere attaccato un altro segmento polinucleotide in modo da determinare la replicazione del segmento attaccato. Un "vettore di espressione" è un vettore di DNA che contiene sequenze di regolazione che dirigono la sintesi del polipeptide da parte di una cellula ospite appropriata. Questo di solito significa un promotore per legare l'RNA polimerasi e iniziare la trascrizione dell'mRNA, così come siti di legame per i ribosomi e segnali di iniziazione per

dirigere la traduzione dell'mRNA in uno o più polipeptid(e)i. L'incorporazione di una sequenza polinucleotidica in un vettore di espressione nel sito appropriato e nel corretto frame di lettura, seguita dalla trasformazione di una cellula ospite appropriata da parte del vettore, permette la produzione di un polipeptide codificato da detta sequenza polinucleotidica.

"Amplificazione" di sequenze polinucleotidiche è la produzione in vitro di copie multiple di una particolare sequenza di acido nucleico. La sequenza amplificata è di solito sotto forma di DNA. Una varietà di tecniche per realizzare tale amplificazione è descritta nei seguenti articoli di rassegna: Van Brunt 1990, *Bio/Technol.*, 8(4):291-294; and Gill and Ghaemi, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 Mar;27(3):224-43. La reazione a catena della polimerasi o PCR è un prototipo di amplificazione dell'acido nucleico, e l'uso della PCR qui dovrebbe essere considerato esemplare di altre tecniche di amplificazione adatte.

La struttura generale degli anticorpi nella maggior parte dei vertebrati (compresi i mammiferi) è ormai ben compresa (Edelman, G. M., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 190: 5 (1971)). Gli anticorpi convenzionali consisto-

no in due catene polipeptidiche leggere identiche di peso molecolare di circa 23.000 dalton (la "catena leggera"), e due catene pesanti identiche di peso molecolare 53.000-70.000 (la "catena pesante"). Le quattro catene sono unite da legami di disolfuro in una configurazione a "Y" in cui le catene leggere raggruppano le catene pesanti che partono dalla bocca della configurazione a "Y". La porzione di "ramo" della configurazione "Y" è designata la regione  $F_{ab}$ ; la porzione di gambo della configurazione "Y" è designata la regione  $F_c$ . L'orientamento della sequenza aminoacidica va dall'estremità N-terminale nella parte superiore della configurazione a "Y" all'estremità C-terminale nella parte inferiore di ogni catena. L'estremità N-terminale possiede la regione variabile che ha specificità per l'antigene che l'ha suscitata, ed è approssimativamente 100 aminoacidi di lunghezza, essendoci leggere variazioni tra la catena leggera e pesante e da anticorpo a anticorpo.

La regione variabile è legata in ogni catena a una regione costante che estende la lunghezza rimanente della catena e che all'interno di una particolare classe di anticorpi non varia con la specificità dell'anticorpo (cioè l'antigene che lo suscita). Ci sono cinque classi principali conosciute di regioni

costanti che determinano la classe della molecola di immunoglobulina (IgG, IgM, IgA, IgD e IgE corrispondenti alle regioni costanti delle catene pesanti gamma, mu, alfa, delta ed epsilon). La regione o classe costante determina la successiva funzione effettrice dell'anticorpo, compresa l'attivazione del complemento (Kabat, E. A., *Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry*, 2nd Ed., p. 413-436, Holt, Rinehart, Winston (1976)), e altre risposte cellulari (Andrews, D. W., et al., *Clinical Immunobiology*, pp 1-18, W. B. Sanders (1980) Kohl, S., et al., *Immunologia*, 48: 187 (1983)); mentre la regione variabile determina l'antigene con cui reagirà. Le catene leggere sono classificate come kappa o lambda. Ogni classe di catena pesante può essere accoppiata con una catena leggera kappa o lambda. Le catene leggere e pesanti sono legate tra loro in modo covalente, e le porzioni "di coda" delle due catene pesanti sono legate tra loro da linkage covalenti di disolfuro quando le immunoglobuline sono generate da ibridomi o da cellule B.

L'espressione "regione variabile" o "VR" si riferisce ai domini all'interno di ogni coppia di catene leggere e pesanti in un anticorpo che sono coinvolti direttamente nel legame dell'anticorpo all'antigene.

Ogni catena pesante ha ad un'estremità un dominio variabile ( $V_H$ ) seguito da un numero di domini costanti. Ogni catena leggera ha un dominio variabile ( $V_L$ ) ad un'estremità e un dominio costante all'altra estremità; il dominio costante della catena leggera è allineato con il primo dominio costante della catena pesante, e il dominio variabile della catena leggera è allineato con il dominio variabile della catena pesante.

Le espressioni "regione determinante per la complementarità", "regione ipervariabile" o "CDR" si riferiscono a una o più delle regioni ipervariabili o determinanti per la complementarità (CDR) trovate nelle regioni variabili delle catene leggere o pesanti di un anticorpo (Si veda Kabat, E. A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987)). Queste espressioni includono le regioni ipervariabili come definite da Kabat et al. ("*Sequences of Proteins of Immunological Interest*," Kabat E., et al., US Dept. of Health and Human Services, 1983) o i circuiti ipervariabili in strutture tridimensionali di anticorpi (Chothia and Lesk, *J Mol. Biol.* 196 901-917 (1987)). I CDR di ogni catena sono tenuti in stretta vicinanza da regioni quadro e, con i CDR dell'altra catena,

contribuiscono alla formazione del sito legante l'antigene. All'interno dei CDR ci sono aminoacidi selezionati che sono stati descritti come le regioni determinanti per la selettività (SDR) che rappresentano i residui critici di contatto utilizzati dal CDR nell'interazione anticorpo-antigene (Kashmiri, S., *Methods*, 36:25-34 (2005)).

Le espressioni "regione quadro" o "FR" si riferiscono a una o più delle regioni quadro all'interno delle regioni variabili delle catene leggere e pesanti di un anticorpo (Si veda Kabat, E. A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987)). Queste espressioni includono quelle regioni di sequenza aminoacidica interposte tra i CDR all'interno delle regioni variabili delle catene leggere e pesanti di un anticorpo.

***Anticorpi anti-NGF e frammenti di legame che hanno attività di legame per NGF***

*Anticorpo Ab1*

La descrizione contempla metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore utilizzando l'anticorpo Ab1 o frammenti di esso, o un anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o all'epitopo sovrapposto come Ab1,

per esempio come indicato sotto, da solo o in associazione con un altro agente attivo, per esempio un FANS o un analgesico oppioide, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75 e/o inibisce o previene il dolore. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**ALVMTQTPSSVSAAVGGTVTINCQASQNIYSNLAWYQQRPGQRPKLLIYGASNLDAGV  
PSRFRGSGSGTEYTLTISDLECDVGTYYCQSAFSDSTENTFGGGTEVVVKR (SEQ ID  
NO: 1).**

La descrizione contempla facoltativamente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono anticorpi chimerici con specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza della catena leggera che comprende

la sequenza indicata di seguito:  
**ALVMTQTPSSVSAAVGGTVTINCQASQNIYSNLAWYQQRPGQRPKLLIYGASNLDAGV  
PSRFRGSGSGTEYTLTISDLECDVGTYYCQSAFSDSTENTFGGGTEVVVKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYS  
LSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2).**

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un al-

tro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono anticorpi chimerici che hanno specificità di legame a NGF e possiedono una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGVI  
TSIGSTVYASWAKGRFTISKSTTTVDLKITSPTTEDTATYFCARGYDDYDEMTYFNIWQQ  
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 3).**

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono anticorpi chimerici con specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza indicata di seguito:

**QSLEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKGLEWIGVI  
TSIGSTVYASWAKGRFTISKSTTTVDLKITSPTTEDTATYFCARGYDDYDEMTYFNIWQQ  
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT  
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPC  
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK  
TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ  
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 4).**

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi comprendono una o più

delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; e SEQ ID NO: 7 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 1 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 2, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; e SEQ ID NO: 10 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 3 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 4, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove l'anticorpo è un frammento che ha specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi dell'invenzione com-

prendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: **2**. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi dell'invenzione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

In un ulteriore esempio della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore comprendono, o in alternativa consistono in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; e SEQ ID NO: 7 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 1 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 2.

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono frammenti aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; e SEQ ID NO: 10 che corrispondono alle regioni che determi-

nano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 3 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 4.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 1, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 3, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; e SEQ ID NO: 7) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 1, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; e SEQ ID NO: 10) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 3.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico anti-NGF è Abl, comprendente, o in alternativa costituito da, SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 4, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per l'uso qui comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (frammento legante l'antigene) aventi specificità di legame per NGF o un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto come Ab1. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab1, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 1 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 3. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 1 e/o SEQ ID NO: 3 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione, descritto qui (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab1. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia

adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Anticorpo Ab2*

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad es, un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono anticorpi chimerici o umanizzati aventi specificità di legame a NGF, dove l'anticorpo è l'anticorpo Ab2 o frammenti di esso, o un anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o a un epitopo sovrapposto come Ab2, per esempio come indicato sotto, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici o umanizzati che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata

di seguito:

**DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQNIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLDAGVP  
SRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQSAFSDSTENTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
11).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate

al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

**DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQNIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLDAGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQSAFDSSTENTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI  
FPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSL  
STLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 12).**

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore e che possiedono una sequenza di catena pesante variabile

che comprende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYAMSWVRQAPGKGLEWVGVITSIGSTV  
YASSAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYDDYDEMITYFNIWGQGT  
LVTVSS (SEQ ID NO: 13).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore e che possiedono una sequenza di catena pesante che com-

prende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYAMSWVRQAPGKGLEWVGVITSIGSTV  
YASSAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYDDYDEMITYFNIWGQGT  
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPL  
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 14).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; e SEQ ID NO: 17 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 11 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 12, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; e SEQ ID NO: 20 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 13 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 14, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle

condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14.

In un ulteriore esempio della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono opzionalmente, o in alternativa consistono in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; e SEQ ID NO: 17 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 11 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 12.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 18; SEQ

ID NO: 19; e SEQ ID NO: 20 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 13 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 14.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, inclusi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 11, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 13, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; e SEQ ID NO: 17) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 11, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; e SEQ ID NO: 20) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 13.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico o umanizzato anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del do-

lore e delle condizioni associate al dolore è opzionalmente Ab2, comprendente, o in alternativa costituito da, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 14, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (frammento legante l'antigene) aventi specificità di legame per NGF o un frammento Fab o altro frammento di anticorpo monovalente che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto come Ab2,. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab2, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 11 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 13. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 11 e/o SEQ ID NO: 13 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab2. In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, gli anticorpi anti-NGF come Ab2 o i

loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

### Anticorpo Ab3

La descrizione contempla metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad es, un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono anticorpi chimerici o umanizzati che hanno specificità di legame a NGF, dove l'anticorpo è Ab3 o frammenti di esso, o un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto come Ab3, per esempio come indicato di seguito, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA senza inibire in modo significativo l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**AVLTQTPSPVSAAMGDTVTIKCQSSQSVYKNNYLSWYQQKPGQPPRLLIYDASNLPSGV  
PSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLGDYDDDADNAFGGGTEVVVKR (SEQ ID  
NO: 21).**

La descrizione include anche anticorpi chimerici o il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

to:

**AVLTQTPSPVSAAMGDTVTIKCQSSQSVYKNNYLSWYQQKPGQPPRLLIYDASNLPSGV  
PSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLGDYDDDADNAFGGGTEVVVKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY  
SLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 22).**

La descrizione include inoltre anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza

indicata di seguito:

**QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYVMIVRQAPGKGLEIYIGITWSAGTYAS  
WAKGRFTISKTSSTTVDLKITSPTTEDTATYFCAGGGGSIYDIWGPGLVTVSS (SEQ ID  
NO: 23).**

La descrizione include anche anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza indicata di seguito:

QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYVMIWVRQAPGKGLEIYIGITWSAGTYIAS  
WAKGRFTISKTSSTTVDLKITSPTTEDTATYFCAGGGSIYDIWGPGLVTVSSASTKGPS  
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP  
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24).

La descrizione contempla inoltre anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; e SEQ ID NO: 27 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 21 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 22, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; e SEQ ID NO: 30 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 23 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 24, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e della catena leggera, e le se-

quenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore con specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 24.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; e SEQ ID NO: 27 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 21 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 22.

In un ulteriore esempio della descrizione i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; e SEQ ID NO: 30 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 23 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 24.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione i frammenti degli anticorpi che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 21, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 23, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; e SEQ ID NO: 27) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 21, le regioni determinanti la

complementarità di (SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 29; e SEQ ID NO: 30) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 23.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione l'anticorpo chimerico anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab3, comprendente, o in alternativa costituito da, SEQ ID NO: 22 e SEQ ID NO: 24, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (frammento legante l'antigene) aventi specificità di legame per NGF o un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Ab3. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab3, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 21 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 23. Questo esempio della descrizione, contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 21 e/o SEQ ID

NO: 23 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab3. In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, gli anticorpi anti-NGF come Ab3 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

#### Anticorpo Ab4

La descrizione contempla metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad es, un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono anticorpi chimerici o umanizzati aventi specificità di legame a NGF, dove l'anticorpo è l'anticorpo Ab4 o frammenti di esso, o un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o a un epitopo sovrapposto come Ab4, per esempio come indicato di seguito, in una quantità

terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA senza inibire sensibilmente l'associazione di NGF con p75 e/o per prevenire o trattare efficacemente il dolore. In un esempio, la descrizione, include anticorpi umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQSSQSVYKNNYLSWYQQKPGKAPKLLI  
YDASNLPSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCLGDYDDDADNAFGGGTKVEI  
KR (SEQ ID NO: 31).**

La descrizione include anche anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

**DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQSSQSVYKNNYLSWYQQKPGKAPKLLIYDASNLPSG  
VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCLGDYDDDADNAFGGGTKVEIKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS  
LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 32).**

La descrizione include inoltre anticorpi umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYVMIWVRQAPGKGLEIYIGITWSAGTYY  
ASSAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGGGSIYDIWGQGLTVTVSS  
(SEQ ID NO: 33).**

La descrizione include anche anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza

indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYVMIWVRQAPGKGLEIYIGITWSAGTYY  
ASSAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGGGSIYDIWGQGLTVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
YLSVSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE  
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 34).**

La descrizione contempla inoltre anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; e SEQ ID NO: 37 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 31 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 32, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; e SEQ ID NO: 40 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni iperva-

riabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 33 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 34, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32. In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, i frammenti di anticorpi dell'invenzione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34.

In un ulteriore esempio della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in al-

ternativa consistono in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; e SEQ ID NO: 37 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 31 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 32.

In un ulteriore esempio della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; e SEQ ID NO: 40 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 33 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 34.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno,

due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 31, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 33, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; e SEQ ID NO: 37) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 31, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; e SEQ ID NO: 40) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 33.

In un esempio particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico o umanizzato anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab4, che comprende, o in alternativa consiste in SEQ ID NO: 32 e SEQ ID NO: 34, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in frammenti Fab (frammento legante l'antigene) aventi specificità di legame per NGF o un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto a quello di

Ab14. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab4, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 31 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 33. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 31 e/o SEQ ID NO: 33 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab4. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab4 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

#### Anticorpo Ab5

La descrizione contempla metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo,

ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, in cui gli anticorpi includono opzionalmente Ab5 o frammenti di esso, o un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Ab5, per esempio come indicato di seguito, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSIYSNLAWYQQRPGQPPKLLIYDASTLESGVP  
SRFKGSGSGTEYTLTISGVECADAASYCQQGFTVSDIDNAFGGGTEVVVKR (SEQ ID  
NO: 41).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno una specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza della catena leggera che comprende la

sequenza indicata di seguito:  
**AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSIYSNLAWYQQRPGQPPKLLIYDASTLESGVP  
SRFKGSGSGTEYTLTISGVECADAASYCQQGFTVSDIDNAFGGGTEVVVKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSDKDSTYS  
LSSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 42).**

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore

aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSNYAVGWVRQAPGKGLEWIGIIGRNGNTWYA  
SWARGRFTISKSTTTVDLKITSPSEDTATYFCARGYGRSVAYYVFNIWGPGLTVTVSS  
(SEQ ID NO: 43).**

La descrizione include anche opzionalmente anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza indicata di seguito:

**QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSNYAVGWVRQAPGKGLEWIGIIGRNGNTWYA  
SWARGRFTISKSTTTVDLKITSPSEDTATYFCARGYGRSVAYYVFNIWGPGLTVTVSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSG  
LYLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGGSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 44).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46; e SEQ ID NO: 47 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 41 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 42, e/o una o

più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49; e SEQ ID NO: 50 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 43 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 44, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti facoltativamente comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 42. In un altro esempio opzionale della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alter-

nativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44.

In un ulteriore esempio della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46; e SEQ ID NO: 47 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 41 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 42.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono opzionalmente, o in alternativa consistono in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49; e SEQ ID NO: 50 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 43 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 44.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che

includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 41, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 43, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 46; e SEQ ID NO: 47) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 41, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 49; e SEQ ID NO: 50) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 43.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico anti-NGF incluso opzionalmente per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab5, comprendente, o in alternativa costituito da, SEQ ID NO: 42 e SEQ ID NO: 44, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in

alternativa consistono, in frammenti Fab (frammento legante l'antigene) aventi specificità di legame per NGF o un altro frammento Fab o anticorpo che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto a Ab5. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab5, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 41 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 43. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 41 e/o SEQ ID NO: 43 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab5. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab5 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

Anticorpo Ab6

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono Ab6 o frammenti di esso, o un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Ab6, ad esempio come indicato sotto, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici o umanizzati che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza

indicata di seguito:

**DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPS  
RFSGSGSGTEYLTISLQPDFFATYYCQQGFTVSDIDNAFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
51).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che com-

prende la sequenza indicata di seguito:

**DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPS  
RFSGSGSGTEYLTISLQPDFFATYYCQQGFTVSDIDNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSS  
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 52).**

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile

che comprende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYAVGWVVRQAPGKGLEWVGIHRNGNT  
WYASSARGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYGRSVAYYVFNIWGP  
LTVSS (SEQ ID NO: 53).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante che com-

prende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYAVGWVVRQAPGKGLEWVGIHRNGNT  
WYASSARGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYGRSVAYYVFNIWGP  
LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS  
GVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT  
CPPCA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
TK  
PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS  
FFLYS  
KLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 57 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità

(CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 52, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 54, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio facoltativo della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 52. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono,

o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 57 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 52.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 54.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che

includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 57) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 51, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico o umanizzato anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab6, che comprende, o in alternativa consiste in SEQ ID NO: 52 e SEQ ID NO: 54, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in

alternativa consistono, in frammenti Fab (frammento legante l'antigene) aventi specificità di legame per NGF o un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Ab6. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab6, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53. Questo esempio opzionale della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 51 e/o SEQ ID NO: 53 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab6. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab6 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

Anticorpo Ab7

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono Ab7 o frammenti di esso, o un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Ab7, ad esempio come indicato sotto, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione, include anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile

che comprende la sequenza indicata di seguito:

**ADVVMTQTPASVSQPVGTVTIKCQASEDIYNLLAWYQQKPGQPPKLLIYSASTLASGV  
PSRFKGSVSGTEYTLTISGLECADAATYYCQNNYLVTTYGVAFGGGTEVVVKR (SEQ  
ID NO: 61).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno una specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza della catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

ADVVMTQTPASVSQPVGTVTIKCQASEDIYNLLAWYQQKPGQPPELLIYSASTLASGV  
 PSRFKSGSGTEYTLTISGLECADAATYYCQNNYLVTTYGVAFGGGTEVVVKRTVAAPS  
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY  
 SLSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 62).

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**QEQLKESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYAMIWVRQAPGKGLEYIGYIDTDSAYYA  
 SWVKGRFTISRTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARSYAAAYGGYPATFDPWGPGLTVVSS  
 (SEQ ID NO: 63).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza indicata di seguito:

**QEQLKESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYAMIWVRQAPGKGLEYIGYIDTDSAYYA  
 SWVKGRFTISRTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARSYAAAYGGYPATFDPWGPGLTVVSS  
 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPFAVLQSS  
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
 ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 64).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID

NO: 65; SEQ ID NO: 66; e SEQ ID NO: 67 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 61 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 62, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 69; e SEQ ID NO: 70 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 63 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 64, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF. In un (esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 61 o SEQ

ID NO: 62. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 63 o SEQ ID NO: 64.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 66; e SEQ ID NO: 67 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 61 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 62.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 69; e SEQ ID NO: 70 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena

pesante variabile di SEQ ID NO: 63 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 64.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 61, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 63, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 65; SEQ ID NO: 66; e SEQ ID NO: 67) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 61, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 69; e SEQ ID NO: 70) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 63.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab7, comprendente, o in alternativa costituito da, SEQ ID NO: 62 e SEQ ID

NO: 64, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in frammenti Fab (frammento legante l'antigene) aventi specificità di legame per NGF o un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o a un epitopo sovrapposto come Ab7. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab7, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 61 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 63. Questo esempio della descrizione, contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 61 e/o SEQ ID NO: 63 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio facoltativo della descrizione, qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab7. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab7 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti

tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

Anticorpo Ab8

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, per esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono Ab8 o frammenti di esso, o un altro anticorpo o frammento che si lega allo stesso epitopo o a un epitopo sovrapposto come Ab8, per esempio come indicato sotto, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione, include anticorpi chimerici o umanizzati che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza di cui sotto:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDIYNLLAWYQKPGKVPKLLIYSASTLASGVPS  
RFGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQNNYLVTITYGVAFGGGTKVEIKR (SEQ ID  
NO: 71).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDIYNLLAWYQQKPGKVPKLLIYSASTLASGVPS  
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQNNYLVTYTGVAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI  
FPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLS  
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 72).**

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile

che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMIWVRQAPGKGLEIYIDTDTSAYY  
ASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSYAAYGGYPATFDPWGQGLT  
VTVSS (SEQ ID NO: 73).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza indicata di seguito:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMIWVRQAPGKGLEIYIGYIDTDSAYY  
ASSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSYAAYGGYPATFDPWGQGLT  
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 74).

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 75; SEQ ID NO: 76; e SEQ ID NO: 77 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 71 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 72, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 78; SEQ ID NO: 79; e SEQ ID NO: 80 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 73 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 74, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio facoltativo della descrizione, gli anticorpi della descrizione, o frammenti di essi comprendono, o alternativamente consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e

leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 71 o SEQ ID NO: 72. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 73 o SEQ ID NO: 74.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 75; SEQ ID NO: 76; e SEQ ID NO: 77 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 71 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 72.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 78; SEQ ID NO: 79; e SEQ ID NO: 80 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 73 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 74.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 71, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 73, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 75; SEQ ID NO: 76; e SEQ ID NO: 77) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 71, le regioni determinanti la

complementarità di (SEQ ID NO: 78; SEQ ID NO: 79; e SEQ ID NO: 80) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 73.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico o umanizzato anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab8, che comprende, o in alternativa consiste in SEQ ID NO: 72 e SEQ ID NO: 74, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab8, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 71 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 73 o un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Ab8. Questa forma di realizzazione dell'invenzione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO:

71 e/o SEQ ID NO: 73 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab8. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab8 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

#### Anticorpo Ab9

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono Ab9 o frammenti di esso, o un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Ab9, ad esempio come indicato sotto, in una quantità terapeuticamente efficace che inibi-

sce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio opzionale, la descrizione, include anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza di cui sotto:  
**AYDMTQTPASVSAAVGGTVTIKCQASENIGSYLAWYQQKPGQPPELLIYRASTLASGVP  
 SRFKGS GSGTQFTLTISGVECADAATYYCQQGYNSENLDNAFGGGTEVVVKR (SEQ ID  
 NO: 81).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno una specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza della catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**AYDMTQTPASVSAAVGGTVTIKCQASENIGSYLAWYQQKPGQPPELLIYRASTLASGVP  
 SRFKGS GSGTQFTLTISGVECADAATYYCQQGYNSENLDNAFGGGTEVVVKRTVAAPS  
 VFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY  
 SLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 82).**

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGIDLSMYSMGWVRQAPGKGLEIYIGWISYGGTAYYA  
 SWAKGRFTISKSTTTVELKITSPTIEDTATYFCARETPVNYLDIHWGQGLTVTVSS (SEQ  
 ID NO: 83).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza indicata di seguito:

**QSVVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSMYSMGWVRQAPGKGLEIYIGWISYGGTAYYA  
SWAKGRFTISKSTTTVELKITSPTIEDTATYFCARETPVNYLWDIWGQGLVTVSSASTKG  
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL  
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL  
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT  
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ  
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 84).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 85; SEQ ID NO: 86; e SEQ ID NO: 87 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 81 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 82, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 88; SEQ ID NO: 89; e SEQ ID NO: 90 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 83 o una sequenza a catena

pesante di SEQ ID NO: 84, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio facoltativo della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 81 o SEQ ID NO: 82. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi dell'invenzione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 83 o SEQ ID NO: 84.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 85; SEQ

ID NO: 86; e SEQ ID NO: 87 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 81 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 82.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 88; SEQ ID NO: 89; e SEQ ID NO: 90 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 83 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 84.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera varia-

bile di SEQ ID NO: 81, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 83, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 85; SEQ ID NO: 86; e SEQ ID NO: 87) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 81, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 88; SEQ ID NO: 89; e SEQ ID NO: 90) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 83.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimérico anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab9, comprendente, o in alternativa costituito da, SEQ ID NO: 82 e SEQ ID NO: 84, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab9, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 81 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 83 o un altro frammento

di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Ab9. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 81 e/o SEQ ID NO: 83 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab9. In un altro esempio facoltativo della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab9 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

#### Anticorpo Ab10

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono Ab10 o fram-

menti di esso, o un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Abl0, ad esempio come indicato sotto, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di

seguito:

**AYDMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASENIGSYLAWYQQKPGKVPKLLIYRASTLASGVPS  
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQGYNSENLDNAFGGGTKVEIKR (SEQ ID  
NO: 91).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno una specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che

comprende la sequenza indicata di seguito:

**AYDMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASENIGSYLAWYQQKPGKVPKLLIYRASTLASGVPS  
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQGYNSENLDNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL  
STLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 92).**

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associa-

te al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSMYSMGWVRQAPGKGLLEYIGWISYGGTAY  
 YASSAKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARETPVNYLDIWGQGLTVTV  
 SS (SEQ ID NO: 93).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza indicata di seguito:

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSMYSMGWVRQAPGKGLLEYIGWISYGGTAY  
 YASSAKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARETPVNYLDIWGQGLTVTV  
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
 QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV  
 DKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 94).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 96; e SEQ ID NO: 97 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 91 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 92, e/o una o

più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 98; SEQ ID NO: 99; e SEQ ID NO: 100 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 93 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 94, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 91 o SEQ ID NO: 92. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 93 o SEQ ID NO: 94.

In un ulteriore esempio della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono opzionalmente, o in alternativa consistono in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 96; e SEQ ID NO: 97 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 91 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 92.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 98; SEQ ID NO: 99; e SEQ ID NO: 100 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 93 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 94.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che

includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, inclusi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 91, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 93, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 95; SEQ ID NO: 96; e SEQ ID NO: 97) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 91, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 98; SEQ ID NO: 99; e SEQ ID NO: 100) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 93.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico o umanizzato anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab10, che comprende, o in alternativa consiste in SEQ ID NO: 92 e SEQ ID NO: 94, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e del-

le condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab10, il frammento Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 91 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 93 o un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Ab10. Questo esempio della descrizione contempla inoltre facoltativamente aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 91 e/o SEQ ID NO: 93 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab10. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab10 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esem-

pio lievito diploide come diploide Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

Anticorpo Ab11

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono 1 o frammenti di esso, o un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto come Ab11, per esempio come indicato di seguito, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio opzionale, la descrizione include anticorpi chimerici che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**AFELTQTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQNIVTNLAWYQQKPGQPPELLIYGASTLASGVSS  
RFKGSQSGTQFTLTISDLECADAAATYFCQSYDGFNSAGFGGGTEVVVKR (SEQ ID NO:  
101).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno una specificità di legame a NGF e che possiedo-

no una sequenza della catena leggera che comprende la

sequenza indicata di seguito:

**AFELTQTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQNIVTNLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTLASGVSS  
RFKGS GSGTQFTLTISDLECADAAATYFCQSYDGFNSAGFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFP  
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST  
LTLSKADYEHKVKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 102).**

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile che compren-

de la sequenza indicata di seguito:

**QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSGYDMSWVRQAPGKGLEIYGLISYDGNTYYA  
TWAKGRFTISKSTTTVDLKITSPPTEDTATYFCARSLYAGPNAGIGPFNIWGQGLVTVSS  
(SEQ ID NO: 103).**

La descrizione include anche opzionalmente anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza

indicata di seguito:

**QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSGYDMSWVRQAPGKGLEIYGLISYDGNTYYA  
TWAKGRFTISKSTTTVDLKITSPPTEDTATYFCARSLYAGPNAGIGPFNIWGQGLVTVSS  
ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 104).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 106; e SEQ ID NO: 107 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 101 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 102, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 108; SEQ ID NO: 109; e SEQ ID NO: 110 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 103 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 104, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio facoltativo della descrizione, gli anticorpi della descrizione o frammenti di essi facoltativamente comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle

condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 101 o SEQ ID NO: 102. In un altro esempio opzionale della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 103 o SEQ ID NO: 104.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 106; e SEQ ID NO: 107 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 101 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 102.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 108;

SEQ ID NO: 109; e SEQ ID NO: 110 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 103 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 104.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 101, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 103, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 105; SEQ ID NO: 106; e SEQ ID NO: 107) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 101, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 108; SEQ ID NO: 109; e SEQ ID NO: 110) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 103.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle

condizioni associate al dolore è Ab11, comprendente, o in alternativa costituito da, SEQ ID NO: 102 e SEQ ID NO: 104, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab11, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 101 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 103 o comprende un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come 1. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 101 e/o SEQ ID NO: 103 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore mediante digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab11. In

un altro esempio facoltativo della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab11 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab12

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio, un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono Ab12 o frammenti di esso, f o un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto come Ab12, o esempio come indicato di seguito, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leg-

gera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**AFQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIVTNLAWYQQKPGKVPKLLIYGASTLASGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQSYDGFNSAGFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
111).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

**AFQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIVTNLAWYQQKPGKVPKLLIYGASTLASGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQSYDGFNSAGFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST  
LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 112).**

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLSGYDMSWVRQAPGKGLEWVGLISYDGNT  
YYATSAKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSLYAGPNAGIGPFNIWGQG  
TLVTVSS (SEQ ID NO: 113).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in

possesso di una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza indicata di seguito:  
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLSGYDMSWVRQAPGKGLEWVGLISYDGN  
YYATSAKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARSLYAGPNAGIGPFNIWGQG  
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP  
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ  
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 114).

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 116; e SEQ ID NO: 117 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 111 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 112, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 118; SEQ ID NO: 119; e SEQ ID NO: 120 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 113 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 114, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio facoltativo della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in al-

ternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio opzionale della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 111 o SEQ ID NO: 112. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 113 o SEQ ID NO: 114.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 115; SEQ ID NO: 116; e SEQ ID NO: 117 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena

leggera variabile di SEQ ID NO: 111 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 112.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 118; SEQ ID NO: 119; e SEQ ID NO: 120 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 113 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 114.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio facoltativo della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, inclusi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 111, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 113, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 115; SEQ ID

NO: 116; e SEQ ID NO: 117) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 111, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 118; SEQ ID NO: 119; e SEQ ID NO: 120) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 113.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico o umanizzato anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab12, che comprende, o in alternativa consiste in SEQ ID NO: 112 e SEQ ID NO: 114, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab12, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 111 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 113 o comprende un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o a un epitopo sovrapposto come Ab12. Questo esempio opzionale della descrizione

contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 111 e/o SEQ ID NO: 113 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab12. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab12 o i loro frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come le cellule CHO, NSO o HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come le cellule di lievito (per esempio lievito diploide come *Pichia diploide*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab13

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad esempio un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono Ab13 o frammenti di esso, o un altro anticorpo o frammento di

anticorpo che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Ab13, ad esempio come indicato sotto, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**AAVLTQTPSPVSAAVGGTVSISCQSSQNVYKNNYLSWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASG  
VPSRFKGGGSGTDFTLTISDVQCDAATYYCAGGYTSSSDNAFGGGTEVVVKR (SEQ  
ID NO: 121).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno una specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza della catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

**AAVLTQTPSPVSAAVGGTVSISCQSSQNVYKNNYLSWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASG  
VPSRFKGGGSGTDFTLTISDVQCDAATYYCAGGYTSSSDNAFGGGTEVVVKRTVAAP  
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST  
YLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 122).**

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di

una sequenza di catena pesante variabile che compren-

de la sequenza indicata di seguito:

**QSVEASGGRLVTPGTPLTLCTASGFSLSTYWMSWVRQAPGKGLEWIGDIYFSNEETNY  
ASWAKGRFTISKSTTTVDLNVISPTTEDTATYFCARGSPDVIDIGIDMWGPGTLVTVSS  
(SEQ ID NO: 123).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante che comprende la se-

quenza indicata di seguito:

**QSVEASGGRLVTPGTPLTLCTASGFSLSTYWMSWVRQAPGKGLEWIGDIYFSNEETNY  
ASWAKGRFTISKSTTTVDLNVISPTTEDTATYFCARGSPDVIDIGIDMWGPGTLVTVSSAS  
TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
YLSVVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYA  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE  
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 124).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 126; e SEQ ID NO: 127 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 121 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 122, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 128;

SEQ ID NO: 129; e SEQ ID NO: 130 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 123 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 124, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio facoltativo della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, la sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 121 o SEQ ID NO: 122. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 123 o SEQ ID NO: 124.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di le-

game a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 126; e SEQ ID NO: 127 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 121 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 122.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 128; SEQ ID NO: 129; e SEQ ID NO: 130 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 123 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 124.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i fram-

menti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 121, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 123, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 125; SEQ ID NO: 126; e SEQ ID NO: 127) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 121, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 128; SEQ ID NO: 129; e SEQ ID NO: 130) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 123.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab13, comprendente, o in alternativa costituito da, SEQ ID NO: 122 e SEQ ID NO: 124, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per

NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab13, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 121 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 123 o comprende un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o a un epitopo sovrapposto come Ab13. Questo esempio opzionale della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 121 e/o SEQ ID NO: 123 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab13. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab13 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

Anticorpo Ab14

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad es, un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono anticorpi chimerici con specificità di legame a NGF, dove l'anticorpo è Ab14 o frammenti di esso, o un altro anticorpo o frammento che si lega allo stesso epitopo o a un epitopo sovrapposto come Ab14, per esempio come indicato sotto, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio opzionale, la descrizione, include anticorpi chimerici o umanizzati che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQNVYKNNYLSWYQQKPGKVPKLLIYKASTLASG  
VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGGYTSSSDNAFGGGTKVEIKR (SEQ ID  
NO: 131).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCQSSQNVYKNNYLSWYQQKPGKVPKLLIYKASTLASG  
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCAGGYTSSSDNAFGGGTKVEIKRTVAAPSV  
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS  
 LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 132).

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile

che comprende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSTYWMSWVRQAPGKGLEWVGDYFSNEET  
 NYASSAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSPDVDIGIDMWGPGTLV  
 TVSS (SEQ ID NO: 133).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSTYWMSWVRQAPGKGLEWVGDYFSNEET  
 NYASSAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSPDVDIGIDMWGPGTLV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAV  
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPE  
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
 EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
 VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 134).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID

NO: 135; SEQ ID NO: 136; e SEQ ID NO: 137 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 131 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 132, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 138; SEQ ID NO: 139; e SEQ ID NO: 140 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 133 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 134, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio facoltativo della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 131 o SEQ ID NO:

132. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 133 o SEQ ID NO: 134.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono opzionalmente, o in alternativa consistono in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 136; e SEQ ID NO: 137 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 131 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 132.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 138; SEQ ID NO: 139; e SEQ ID NO: 140 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena

pesante variabile di SEQ ID NO: 133 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 134.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 131, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 133, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 135; SEQ ID NO: 136; e SEQ ID NO: 137) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 131, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 138; SEQ ID NO: 139; e SEQ ID NO: 140) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 133.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico o umanizzato anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab14, che comprende, o in alternativa consiste in SEQ ID

NO: 132 e SEQ ID NO: 134, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab14, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 131 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 133 o un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come

Ab14. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 131 e/o SEQ ID NO: 133 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab14. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab14 o i loro frammenti Fab per il trattamento o

la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come le cellule CHO, NSO o HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come le cellule di lievito (per esempio lievito diploide come *Pichia diploide*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### *Anticorpo Ab15*

La descrizione contempla metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad es, un FANS o un analgesico oppioide, in cui gli anticorpi includono anticorpi chimerici aventi specificità di legame a NGF in cui l'anticorpo è Ab15 o frammenti di esso, per esempio come indicato di seguito, o comprende un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto come Ab15, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA senza inibire sensibilmente l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una se-

quenza di catena leggera variabile che comprende la

sequenza indicata di seguito:

**AAVLTQTPSPVSAAVGDTVTIKCQSSQSVYKNNYLSWYQQKPGQPPKLLIYDASNLP  
SGVPSRFGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLGDYDDDDTDNGFGGGTEVVVKR (SEQ  
ID NO: 141).**

La descrizione include anche anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno una specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

**AAVLTQTPSPVSAAVGDTVTIKCQSSQSVYKNNYLSWYQQKPGQPPKLLIYDASNLP  
SGVPSRFGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLGDYDDDDTDNGFGGGTEVVVKRTVAAP  
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST  
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 142).**

La descrizione include inoltre anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza

indicata di seguito:

**QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAMIWVRQAPGKGLEIYIHWSSGGTYATW  
AKGRFTISKSTTTVDLQITSPTTEDAATYFCAAGGGSYDVGWPGTLVTVSS (SEQ ID  
NO: 143).**

La descrizione include anche anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di ca-

tena pesante che comprende la sequenza indicata di

seguito:

**QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAMIWVRQAPGKGLEIYIGIHWSSGGTYATW  
AKGRFTISKSTTTVDLQITSPTTEDAATYFCAAGGGSIYDVWGPGLVTVSSASTKGPSV  
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP  
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOG  
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 144).**

La descrizione contempla inoltre anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 145; SEQ ID NO: 146; e SEQ ID NO: 147 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 141 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 142, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 148; SEQ ID NO: 149; e SEQ ID NO: 150 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 143 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 144, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti per il trattamento o la prevenzione del do-

lore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e della catena leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 141 o SEQ ID NO: 142. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 143 o SEQ ID NO: 144.

In un ulteriore esempio della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 145; SEQ ID NO: 146; e SEQ ID NO: 147 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervaria-

bili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 141 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 142.

In un ulteriore esempio della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 148; SEQ ID NO: 149; e SEQ ID NO: 150 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 143 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 144.

La descrizione contempla anche frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, inclusi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 141, la regione

a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 143, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 145; SEQ ID NO: 146; e SEQ ID NO: 147) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 141, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 148; SEQ ID NO: 149; e SEQ ID NO: 150) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 143.

In un esempio particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Abl5, comprendente, o in alternativa costituito da, SEQ ID NO: 142 e SEQ ID NO: 144, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (frammento legante l'antigene) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Abl5, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 141 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 143 o comprende un altro Fab che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrappo-

sto come Ab15. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 141 e/o SEQ ID NO: 143 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab15. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore, come Ab15 o frammenti Fab, possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammiferi come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come *Pichia diploide*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab16

La descrizione contempla metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad es, un FANS o un analgesico oppioide, in cui gli anticorpi includono anticorpi chimerici aventi speci-

ficità di legame a NGF in cui l'anticorpo è Abl6 o frammenti di esso, per esempio come indicato di seguito, o comprende un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto come Abl6, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA senza inibire sensibilmente l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**ALVMTQTPSSTSEPVGGTVTINCQASQNIQNDLSWYQQKPGQPPELLIYSTSKLATGVPK  
RFSGSRSGTQFTLTISDLECDAAATYYCLGVYSYISDDGNAFGGGTEVVVKR (SEQ ID  
NO: 151).**

La descrizione include anche anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**ALVMTQTPSSTSEPVGGTVTINCQASQNIQNDLSWYQQKPGQPPELLIYSTSKLATGVPK  
RFSGSRSGTQFTLTISDLECDAAATYYCLGVYSYISDDGNAFGGGTEVVVKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS  
LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 152).**

La descrizione include inoltre anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del

dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**QSVVEFGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNNYAMTWVRQAPGKGLEWIGIISIGTTTYAS  
 WAKGRFFISKSTTTVDLKIISPTTEDTATYFCARDAGVTVDGYGYFYFNIWGPGLTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 153).**

La descrizione include anche anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza

indicata di seguito:  
**QSVVEFGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNNYAMTWVRQAPGKGLEWIGIISIGTTTYAS  
 WAKGRFFISKSTTTVDLKIISPTTEDTATYFCARDAGVTVDGYGYFYFNIWGPGLTVTVSS  
 ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGG  
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
 ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 154).**

La descrizione contempla inoltre anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 155; SEQ ID NO: 156; e SEQ ID NO: 157 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 151 o una sequenza a

catena leggera di SEQ ID NO: 152, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 159; e SEQ ID NO: 160 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 153 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 154, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e della catena leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 151 o SEQ ID NO: 152. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione per il trattamento o la pre-

venzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 153 o SEQ ID NO: 154.

In un ulteriore esempio della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 155; SEQ ID NO: 156; e SEQ ID NO: 157 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 151 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 152.

In un ulteriore esempio della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 159; e SEQ ID NO: 160 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile

di SEQ ID NO: 153 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 154.

La descrizione contempla anche frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 151, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 153, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 155; SEQ ID NO: 156; e SEQ ID NO: 157) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 151, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 158; SEQ ID NO: 159; e SEQ ID NO: 160) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 153.

In un esempio particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico o umanizzato anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab16, che comprende, o in alternativa consiste in SEQ ID NO: 152 e

SEQ ID NO: 154, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (frammento legante l'antigene) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Abl6, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 151 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 153 o comprende un altro Fab o un altro frammento di anticorpo bivalente o monovalente che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Abl6. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 151 e/o SEQ ID NO: 153 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Abl6. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle con-

dizioni associate al dolore, come Ab16 o frammenti Fab, possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammiferi come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come *Pichia diploide*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab17

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad es, un FANS o un analgesico oppioide, in cui gli anticorpi includono anticorpi chimerici con specificità di legame a NGF in cui l'anticorpo è Ab17 o frammenti di esso, per esempio come indicato di seguito, o comprende un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto a Ab17, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena

leggera variabile che comprende la sequenza indicata

di seguito:

**AIEMTQTPFSVSAAVGGTVTIKCQASQTISNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASNLESGVPS  
RFKGS GSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQQGYTISNVDNNVFGGGTEVVVKR (SEQ ID  
NO: 161).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno una specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza della catena leggera che comprende la

sequenza indicata di seguito:

**AIEMTQTPFSVSAAVGGTVTIKCQASQTISNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASNLESGVPS  
RFKGS GSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQQGYTISNVDNNVFGGGTEVVVKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS  
LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 162).**

La descrizione, inoltre, include facoltativamente anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante variabile che compren-

de la sequenza indicata di seguito:

**QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCAASGSLTGYNLVWVRQAPGKGLEWIGFISYGDTTYA  
SWAKGRFTISKSTTVTLTITDLQPSDTGTYFCARETANTYDYGIWGPGLVTVSS (SEQ  
ID NO: 163).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono

una sequenza di catena pesante che comprende la se-

quenza indicata di seguito:

**QSLEESGGRLVTPGGSLTLTCAASGFSLTGYNLVWVRQAPGKGLEWIGFISYGDTTYA  
SWAKGRFTISKSTTTVTLTITDLQPSDTGTGYFCARETANTYDYGIWGPGLVTVSSASTK  
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYS  
LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM  
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 164).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 165; SEQ ID NO: 166; e SEQ ID NO: 167 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 161 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 162, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 168; SEQ ID NO: 169; e SEQ ID NO: 170 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 163 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 164, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio opzionale della descrizione, gli anticorpi della descrizione o frammenti di essi per il trattamento o la

prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 161 o SEQ ID NO: 162. In un altro esempio opzionale della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 163 o SEQ ID NO: 164.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 165; SEQ ID NO: 166; e SEQ ID NO: 167 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o

regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 161 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 162.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 168; SEQ ID NO: 169; e SEQ ID NO: 170 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 163 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 164.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, inclusi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO:

161, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 163, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 165; SEQ ID NO: 166; e SEQ ID NO: 167) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 161, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 168; SEQ ID NO: 169; e SEQ ID NO: 170) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 163.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab17, comprendente, o in alternativa costituito da, SEQ ID NO: 162 e SEQ ID NO: 164, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab17, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 161 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 163 o comprende un

altro Fab o frammento di anticorpo monovalente o bivalente che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto come Ab15,. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 161 e/o SEQ ID NO: 163 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab17. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab17 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

#### Anticorpo Ab18

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad es, un FANS o un analgesico oppioide, in cui gli anticorpi includono anticorpi chi-

merici con specificità di legame a NGF in cui l'anticorpo è Ab18 o frammenti di esso, per esempio come indicato di seguito, o comprende un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto a Ab18, in una quantità terapeutica-mente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQTISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLESGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQGYTISNVDNNVFGGGTKVEIKR (SEQ ID  
NO: 171).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQTISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLESGVPS  
RFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQGYTISNVDNNVFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI  
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS  
STLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 172).**

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o

la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile

che comprende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSGYNLVWVRQAPGKGLEWVGFISYGDTTY  
YASSAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARETANTYDYGIVGQGLTVV  
SS (SEQ ID NO: 173).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante che com-

prende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSGYNLVWVRQAPGKGLEWVGFISYGDTTY  
YASSAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARETANTYDYGIVGQGLTVV  
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ  
SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL  
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP  
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
DKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 174).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 175; SEQ ID NO: 176; e SEQ ID NO: 177 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 171 o

una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 172, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 178; SEQ ID NO: 179; e SEQ ID NO: 180 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 173 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 174, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e della catena leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 171 o SEQ ID NO: 172. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o

in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 173 o SEQ ID NO: 174.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 175; SEQ ID NO: 176; e SEQ ID NO: 177 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 171 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 172.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 178; SEQ ID NO: 179; e SEQ ID NO: 180 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 173 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 174.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, inclusi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 171, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 173, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 175; SEQ ID NO: 176; e SEQ ID NO: 177) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 171, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 178; SEQ ID NO: 179; e SEQ ID NO: 180) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 173.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico o umanizzato anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab18, che comprende, o in alternativa consiste in SEQ ID

NO: 172 e SEQ ID NO: 174, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab18, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 171 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 173 o comprendono un altro Fab o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o a quello sovrapposto come Ab18. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 171 e/o SEQ ID NO: 173 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab18. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab18 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o

sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Anticorpo Ab19*

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad es, un FANS o un analgesico oppioide, in cui gli anticorpi includono anticorpi chimerici con specificità di legame a NGF in cui l'anticorpo è Ab19 o frammenti di esso, per esempio come indicato di seguito, o comprende un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto a Ab19, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata

di seguito:

**AAVLTQTSPVSAAVGGTVSISQSSQNVYKNNYLSWYQQKPGPPKLLIYKASTLASG  
VPSRFKGSVSGTDFTLTISDVQCDAATYYCAGGYSSSSDNAFGGGTEVVVKR (SEQ ID  
NO: 181).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno una specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza della catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

**AAVLTQTPSPVSAAVGGTVSISCQSSQNVYKNNYLSWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASG  
VPSRFKGSVSGTDFTLTISDVQCDAATYYCAGGYSSSSDNAFGGGTEVVVKRTVAAPS  
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY  
SLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 182).**

La descrizione, inoltre, include facoltativamente anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**QSVEASGGRLVMPGGSLTCTASGFSLSYWMSWVRQAPGKGLEWIGDIYFSNEETN  
YATWAKGRFTISKSTTTVDLNVISPTTEDTATYFCARGSPDVEIAIDMWGQGLTVSS  
(SEQ ID NO: 183).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza indicata di seguito:

QSVEASGGRLVMPGGSLTLTCTASGFSLSTYWMSWVRQAPGKGLEWIGDIYFSNEETN  
YATWAKGRFTISKSTSTTVDLNVISPTTEDTATYFCARGSPDVEIAIDMWGQGTLVTVSSA  
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK  
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 184).

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 185; SEQ ID NO: 186; e SEQ ID NO: 187 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 181 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 182, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 188; SEQ ID NO: 189; e SEQ ID NO: 190 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 183 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 184, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in combina-

zioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e della catena leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 181 o SEQ ID NO: 182. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 183 o SEQ ID NO: 184.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 185; SEQ ID NO: 186; e SEQ ID NO: 187 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena

leggera variabile di SEQ ID NO: 181 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 182.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 188; SEQ ID NO: 189; e SEQ ID NO: 190 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 183 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 184.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio facoltativo della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 181, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 183, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 185; SEQ

ID NO: 186; e SEQ ID NO: 187) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 181, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 188; SEQ ID NO: 189; e SEQ ID NO: 190) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 183.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab19, comprendente, o in alternativa costituito da, SEQ ID NO: 182 e SEQ ID NO: 184, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab19, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 181 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 183 o comprende un altro Fab o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o a un epitopo sovrapposto come Ab19. Questo esempio opzionale della descrizione contempla

inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 181 e/o SEQ esempio della descrizione, e mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab19. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab19 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab20

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad es, un FANS o un analgesico oppioide, in cui gli anticorpi includono anticorpi chimerici con specificità di legame a NGF in cui l'anticorpo è Ab20 o frammenti di esso, per esempio come indicato di seguito, o comprende un altro anticorpo o

frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto a Ab20, in una quantità terapeutica-mente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQNVYKNNYLSWYQQKPGKVPKLLIYKASTLASG  
VPSRFGSGSGTDFLTITISLQPEDVATYYCAGGYTSSSDNAFGGGTKVEIKR (SEQ ID  
NO: 191).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che com-

prende la sequenza indicata di seguito:  
**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSQNVYKNNYLSWYQQKPGKVPKLLIYKASTLASG  
VPSRFGSGSGTDFLTITISLQPEDVATYYCAGGYTSSSDNAFGGGTKVEIKRTVAAPSV  
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS  
LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 192).**

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in

possesso di una sequenza di catena pesante variabile

che comprende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSTYWMSWVRQAPGKGLEWVGDYFSNEET  
 NYATSAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSPDVEIAIDMWGQGLV  
 TVSS (SEQ ID NO: 193).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante che com-

prende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSTYWMSWVRQAPGKGLEWVGDYFSNEET  
 NYATSAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSPDVEIAIDMWGQGLV  
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV  
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPE  
 LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
 EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
 PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT  
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 194).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 196; e SEQ ID NO: 197 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 191 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 192, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 198;

SEQ ID NO: 199; e SEQ ID NO: 200 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 193 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 194, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e della catena leggera, e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche, facoltativamente, frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 191 o SEQ ID NO: 192. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 193 o SEQ ID NO: 194.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 196; e SEQ ID NO: 197 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 191 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 192.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 198; SEQ ID NO: 199; e SEQ ID NO: 200 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 193 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 194.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i fram-

menti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 191, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 193, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 195; SEQ ID NO: 196; e SEQ ID NO: 197) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 191, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 198; SEQ ID NO: 199; e SEQ ID NO: 200) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 193.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico o umanizzato anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab20, che comprende, o in alternativa consiste in SEQ ID NO: 192 e SEQ ID NO: 194, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per

NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab20, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 191 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 193. Questa forma di realizzazione dell'invenzione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 191 e/o SEQ ID NO: 193 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio facoltativo della descrizione, qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab20. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore, come Ab20 o frammenti Fab, possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammiferi come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come *Pichia diploide*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

Anticorpo Ab21

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore e dei disturbi specifici associati al dolore da soli o in associazione con un altro agente attivo, ad es, un FANS o un analgesico oppioide, dove gli anticorpi includono anticorpi chimerici con specificità di legame a NGF, dove l'anticorpo è Ab21 o frammenti di esso, o un altro anticorpo o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o a un epitopo sovrapposto come Ab5, per esempio come indicato sotto, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include anticorpi chimerici o umanizzati che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPS  
RFGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQGFTVSDIDNAFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO:  
51).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPS  
 RFGSGSGTEYTLTISSLQPDFATYYCQQGFTVSDIDNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF  
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS  
 TLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 401).

La descrizione include inoltre, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante variabile che comprende la sequenza indicata di seguito:  
**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYAVGWVVRQAPGKGLEWVGIIGRNGNT  
 WYASSARGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYGRSVAYYVFNIWGPGT  
 LTVSS (SEQ ID NO: 53).**

La descrizione include anche, facoltativamente, anticorpi chimerici o umanizzati per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF e in possesso di una sequenza di catena pesante che comprende la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYAVGWVVRQAPGKGLEWVGIIGRNGNT  
 WYASSARGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYGRSVAYYVFNIWGPGT  
 LTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTHTCPPCPA  
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS  
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 402).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendo-

no una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 57 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 401, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 402, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio facoltativo della descrizione, gli anticorpi della descrizione o i loro frammenti comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, le sequenze variabili della catena pesante e leggera e le sequenze della catena pesante e leggera di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione per il trattamento o la prevenzione del do-

lore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 401. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 402.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 57 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 401.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti dell'anticorpo con specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in una o più

delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 402.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 57) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 51, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, l'anticorpo chimerico o umanizzato

anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Ab21, che comprende, o in alternativa consiste in SEQ ID NO: 401 e SEQ ID NO: 402, e con almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un ulteriore esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab21, il frammento Fab include la sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 e la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o un altro frammento di anticorpo Fab o monovalente che si lega allo stesso epitopo o sovrapposto come Ab5,. Questo esempio della descrizione contempla inoltre aggiunte, delezioni e varianti di SEQ ID NO: 51 e/o SEQ ID NO: 53 in detto Fab pur mantenendo la specificità di legame per NGF.

In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione

enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab21. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore, come Ab21 o frammenti Fab, possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammiferi come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come *Pichia diploide*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Frammento di anticorpo Fab1*

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore utilizzando il frammento anticorpale Fab1 o frammenti di esso, per esempio come indicato di seguito, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include opzionalmente frammenti di anticorpi Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQSIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESQVPS  
 RFGSGSGTEYTLTISSLQPDDFATYYCQQGFTVSDIDNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF  
 PPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFVPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSS  
 TLTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 405).

La descrizione include inoltre opzionalmente frammenti di anticorpi Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno una specificità di legame a NGF e possiedono una sequenza di catena pesante che comprende

la sequenza indicata di seguito:

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYAVGWVVRQAPGKGLEWVGIHGRNGNT  
 WYASSARGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYGRSVAYYVFNIWGPGT  
 LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
 AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTH (SEQ ID  
 NO: 406).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 57 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 405, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena

pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 406, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio opzionale della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, delle sequenze di catene pesanti e leggere variabili e delle sequenze di catene pesanti e leggere di cui sopra, comprese tutte.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpo della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 405. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 406.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF com-

prendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 5 esempio dell'nd alle regioni determinanti la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 405.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 406.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno,

due, tre o più, compresi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53, le regioni determinanti la complementarità di SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 57) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 51, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, il frammento di anticorpo anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Fab1, che comprende SEQ ID NO: 405 e SEQ ID NO: 406, o un altro Fab o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o al sovrapposto come Fab1, e che ha almeno una delle attività biologiche qui indicate. In un esempio della descrizione, il frammento di anticorpo Fab1 può essere prodotto dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab21.

#### Frammento di anticorpo Fab2

La descrizione contempla opzionalmente metodi di trattamento del dolore utilizzando il frammento anticorpale Fab2 o frammenti di esso, per esempio come

indicato di seguito, in una quantità terapeuticamente efficace che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. In un esempio, la descrizione include frammenti di anticorpi Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e che possiedono una sequenza di catena leggera che comprende la sequenza indicata di seguito:

**DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCQASQSIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYDASTLESGVPS  
RFSGSGSGTEYTLTISSLPDDFATYYCQQGFTVSDIDNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF  
PPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFVPEAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSS  
TLTSLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 407).**

La descrizione include inoltre opzionalmente frammenti di anticorpi Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF e possiedono una sequenza di catena pesante che comprende la

sequenza indicata di seguito:  
**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYAVGWVVRQAPGKGLEWVGIIGRNGNT  
WYASSARGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYGRSVAYYVFNIWGPGT  
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDARVEPKSCDKTH (SEQ ID  
NO: 408).**

La descrizione contempla inoltre opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprendono una o più delle sequenze polipeptidi-

che di SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 57 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 407, e/o una o più sequenze di polipeptide con SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 408, o combinazioni di queste sequenze polipeptidiche. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in combinazioni di uno o più dei CDR, delle sequenze di catene pesanti e leggere variabili e delle sequenze di catene pesanti e leggere di cui sopra, compresi tutti loro.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti dell'anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi dell'invenzione per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o

in alternativa consistono nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 407. In un altro esempio della descrizione, i frammenti di anticorpi della descrizione per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono, nella sequenza polipeptidica di SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 408.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 57 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 407.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polipeptidiche di SEQ ID NO: 58; SEQ

ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60 che corrispondono alle regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 408.

La descrizione contempla anche opzionalmente frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che includono uno o più dei frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i frammenti degli anticorpi aventi specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, inclusi tutti i seguenti frammenti di anticorpi: la regione della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51, la regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; e SEQ ID NO: 57) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 51, le regioni determinanti la complementarità di (SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; e SEQ ID NO: 60) della regione a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53.

In un esempio opzionale particolarmente preferito della descrizione, il frammento di anticorpo anti-NGF

per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore è Fab2, che comprende SEQ ID NO: 407 e SEQ ID NO: 408, o un altro Fab o frammento di anticorpo che si lega allo stesso epitopo o al sovrapposto come Fab2, e che ha almeno una delle attività biologiche qui indicate.

In un altro esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti tramite espressione in cellule di mammifero come le cellule CHO, NSO o HEK 293, sistemi fungini, insetti, vegetali o microbici come le cellule di lievito (per esempio lievito diploide come *Pichia diploide*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione, il frammento di anticorpo Fab2 può essere prodotto mediante espressione in *Pichia pastoris* utilizzando i protocolli qui esposti negli esempi.

In un altro esempio, i frammenti di anticorpi possono essere presenti in una o più delle seguenti forme non limitative: Forme di anticorpi Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv e Fv a catena singola. In un esempio preferito, gli anticorpi anti-NGF qui descritti comprendono inoltre

la sequenza della catena leggera costante kappa che comprende la sequenza indicata di seguito:

**VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS  
QESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ  
ID NO: 412).**

In un altro esempio opzionale preferito, gli anticorpi anti-NGF qui descritti per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore comprendono inoltre la sequenza polipeptidica della catena pesante costante gamma-1 che comprende la sequenza indicata di seguito:

**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQV  
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP  
PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN  
AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR  
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS  
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 413).**

In un altro esempio opzionale, la descrizione contempla un anticorpo isolato anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che comprende una sequenza polipeptidica V<sub>H</sub> selezionata da: SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193, o 402, o una sua variante; e comprendente inoltre una sequenza polipeptidica V<sub>L</sub> selezionata da: SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, o 401, o una sua variante, dove uno o più dei

residui della struttura (residui FR) in detto polipeptide  $V_H$  o  $V_L$  è stato sostituito con un altro residuo di aminoacido risultante in un anticorpo anti-NGF che lega specificamente NGF. La descrizione contempla forme umanizzate e chimeriche di questi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. Gli anticorpi chimerici possono includere un Fc derivato dalle regioni costanti IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgG6, IgG7, IgG8, IgG9, IgG10, IgG11, IgG12, IgG13, IgG14, IgG15, IgG16, IgG17, IgG18 o IgG19.

In un esempio della descrizione, gli anticorpi o i polipeptidi  $V_H$  o  $V_L$  provengono o sono selezionati da una o più popolazioni di cellule B di coniglio prima dell'inizio del processo di umanizzazione qui menzionato.

In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF e i loro frammenti per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore non hanno specificità di legame per p75 o TrkA. In un ulteriore esempio della descrizione, sono contemplati metodi per il trattamento del dolore che comprendono l'uso degli anticorpi anti-NGF e dei loro frammenti per inibire l'associazione di NGF con p75 e/o TrkA. In un altro esempio della descrizione, sono

contemplati metodi per il trattamento del dolore che comprendono l'uso di anticorpi anti-NGF e loro frammenti per inibire l'associazione di NGF con TrkA e/o multimeri e/o antagonizza i suoi effetti biologici. In un altro esempio della descrizione, sono contemplati metodi per il trattamento del dolore che comprendono l'uso di anticorpi anti-NGF e loro frammenti per inibire l'associazione di NGF con p75 e/o multimeri dello stesso e l'associazione di NGF con TrkA e/o multimeri dello stesso, e antagonizza gli effetti biologici di p75 e TrkA.

Come detto sopra, gli anticorpi e i loro frammenti possono essere modificati post-translazionalmente per aggiungere società effettrici come linkers chimici, società rilevabili come per esempio coloranti fluorescenti, enzimi, substrati, materiali bioluminescenti, materiali radioattivi e società chemiluminescenti, o società funzionali come per esempio streptavidina, avidina, biotina, una citotossina, un agente citotossico e materiali radioattivi.

Per quanto riguarda le società rilevabili, altri enzimi esemplari includono, ma non sono limitati a, perossidasi di rafano, acetilcolinesterasi, fosfatasi alcalina, beta-galattosidasi e luciferasi. Altri materiali fluorescenti esemplari includono, ma non sono

limitati a, rodamina, fluoresceina, isotiocianato di fluoresceina, umbelliferone, diclorotriazinilamina, ficoeritrina e cloruro di dansile. Altre società chemiluminescenti esemplari includono, ma non sono limitate a, luminol. Inoltre materiali bioluminescenti esemplari includono, ma non si limitano a luciferina ed equorina. Altri materiali radioattivi esemplari includono, ma non sono limitati a, Iodio 125 ( $^{125}\text{I}$ ), Carbonio 14 ( $^{14}\text{C}$ ), Zolfo 35 ( $^{35}\text{S}$ ), Trizio ( $^3\text{H}$ ) e Fosforo 32 ( $^{32}\text{P}$ ).

Per quanto riguarda le società funzionali, agenti citotossici esemplari includono, ma non sono limitati a, metotrexato, aminopterina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracile decarbazina; agenti alchilanti come la mecloretamina, il clorambucil della tioepa, il melfalan, la carmustina (BSNU), la mitomicina C, la lomustina (CCNU), l'1-metilnitrosourea, la ciclotosfamida, la mecloretamina, il busulfan, il dibromomannitolo, la streptozotocina, la mitomicina C, il cis-diclorodiammina platino (II) (DDP) il cisplatino e il carboplatino (paraplatino) le antracicline includono daunorubicina (ex daunomicina), doxorubicina (adriamicina), detorubicina, carminomicina, idarubicina, epirubicina, mitoxantrone e bisantrene gli antibiotici includono la dac-

tinomicina (actinomicina D), la bleomicina, la calicheamicina, la mitramicina e l'antramicina (AMC); e gli agenti antimitotici come gli alcaloidi della vinca, la vincristina e la vinblastina. Altri agenti citotossici includono paclitaxel (taxolo), ricina, esotossina di pseudomonas, gemcitabina, citochalasin B, gramicidina D, bromuro di etidio, emetina, etoposide, tenoposide, colchicina, diidrossi antracina dione, 1-deidrotosterone, glucocorticoidi, procaina, tetracaina, lidocaina, propranololo, puromicina, procarbazina, idrossiurea, asparaginasi, corticosteroidi, mytotane (O,P'-(DDD)), interferoni, e miscele di questi agenti citotossici.

Altri agenti citotossici includono, ma non sono limitati a, agenti chemioterapici come carboplatino, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina, calicheamicina, doxorubicina, 5-fluorouracile, mitomicina C, actinomicina D, ciclofosfamide, vincristina e bleomicina. Gli enzimi tossici di piante e batteri come la ricina, la tossina difterica e la tossina di Pseudomonas possono essere coniugati agli anticorpi umanizzati o chimerici, o ai loro frammenti di legame, per generare reagenti di uccisione specifici per il tipo di cellula (Youle, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5483 (1980); Gilliland, et al., Proc. Nat'l Acad.

Sci. USA 77:4539 (1980); Krolick, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5419 (1980)).

Altri agenti citotossici includono le ribonucleasi citotossiche come descritto da Goldenberg in U.S. Pat. N. 6,653,104. Esempi della descrizione si riferiscono anche a radioimmunoconiugati in cui un radionuclide che emette particelle alfa o beta è accoppiato stabilmente all'anticorpo, o frammenti vincolanti dello stesso, con o senza l'uso di un agente formatore di complessi. Tali radionuclidi includono beta-emettitori come Fosforo-32 ( $^{32}\text{P}$ ), Scandio-47 ( $^{47}\text{Sc}$ ), Rame-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), Gallio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), Ittrio-88 ( $^{88}\text{Y}$ ), Ittrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ), Iodio-125 ( $^{125}\text{I}$ ), Iodio-131 ( $^{131}\text{I}$ ), Samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), Lutezio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), Renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ) o Renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), e alfa emettitore come Astatio-211 ( $^{211}\text{At}$ ), Piombo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), Bismuto-212 ( $^{212}\text{Bi}$ ) o -213 ( $^{213}\text{Bi}$ ) o Attinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ).

Altri materiali radioattivi esemplari includono, ma non sono limitati a, Iodio 125 ( $^{125}\text{I}$ ), Carbonio 14 ( $^{14}\text{C}$ ), Zolfo 35 ( $^{35}\text{S}$ ), Trizio ( $^3\text{H}$ ) e Fosforo 32 ( $^{32}\text{P}$ ).

Per quanto riguarda le società funzionali, agenti citotossici esemplari includono, ma non sono limitati a, metotrexato, aminopterina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracile decarbazina;

agenti alchilanti come la mecloretamina, il clorambucil della tioepa, il melfalan, la carmustina (BSNU), la mitomicina C, la lomustina (CCNU), l'1-metilnitrosoarea, la ciclotosfamida, la mecloretamina, il busulfan, il dibromomannitolo, la streptozotocina, la mitomicina C, il cis-diclorodiammina platino (II) (DDP) il cisplatino e il carboplatino (paraplatino) le antracicline includono daunorubicina (ex daunomicina), doxorubicina (adriamicina), detorubicina, carminomicina, idarubicina, epirubicina, mitoxantrone e bisantrene gli antibiotici includono la dactinomicina (actinomicina D), la bleomicina, la calicheamicina, la mitramicina e l'antramicina (AMC); e gli agenti antimitotici come gli alcaloidi della vinca, la vincristina e la vinblastina. Altri agenti citotossici includono paclitaxel (taxolo), ricina, esotossina di pseudomonas, gemcitabina, citochalasin B, gramicidina D, bromuro di etidio, emetina, etoposide, tenoposide, colchicina, diidrossi antracina dione, 1-deidrotosterone, glucocorticoidi, procaina, tetracaina, lidocaina, propranololo, puromicina, procarbazina, idrossiurea, asparaginasi, corticosteroidi, mytotane (O,P'-(DDD)), interferoni, e miscele di questi agenti citotossici.

Altri agenti citotossici includono, ma non sono limitati a, agenti chemioterapici come carboplatino, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina, calicheamicina, doxorubicina, 5-fluorouracile, mitomicina C, actinomicina D, ciclofosfamide, vincristina e bleomicina. Gli enzimi tossici di piante e batteri come la ricina, la tossina difterica e la tossina di *Pseudomonas* possono essere coniugati agli anticorpi umanizzati o chimerici, o ai loro frammenti di legame, per generare reagenti di uccisione specifici per il tipo di cellula (Youle, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5483 (1980); Gilliland, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:4539 (1980); Krolick, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5419 (1980)).

Altri agenti citotossici includono le ribonucleasi citotossiche come descritto da Goldenberg in U.S. Pat. N. 6,653,104. Esempi della descrizione si riferiscono anche a radioimmunoconiugati in cui un radionuclide che emette particelle alfa o beta è accoppiato stabilmente all'anticorpo, o frammenti vincolanti dello stesso, con o senza l'uso di un agente formatore di complessi. Tali radionuclidi includono beta-emettitori come Fosforo-32 ( $^{32}\text{P}$ ), Scandio-47 ( $^{47}\text{Sc}$ ), Rame-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), Gallio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), Ittrio-88 ( $^{88}\text{Y}$ ), Ittrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ), Iodio-125 ( $^{125}\text{I}$ ), Iodio-131 ( $^{131}\text{I}$ ), Sa-

mario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), Lutezio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), Renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ) o Renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), e alfa emettitore come Astatio-211 ( $^{211}\text{At}$ ), Piombo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), Bismuto-212 ( $^{212}\text{Bi}$ ) o -213 ( $^{213}\text{Bi}$ ) o Attinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ).

Nell'arte sono noti metodi per coniugare un anticorpo o un suo frammento legante a una parte rilevabile e simili, come ad esempio i metodi descritti da Hunter et al, Nature 144:945 (1962); David et al, Biochemistry 13:1014 (1974) Pain et al, J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); e Nygren, J., Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982).

Gli esempi qui descritti includono inoltre varianti ed equivalenti che sono sostanzialmente omologhi agli anticorpi, frammenti di anticorpi, diabodi, SMIPs, camelbodies, nanocorpi, IgNAR, polipeptidi, regioni variabili e CDRs qui esposti. Questi possono contenere, ad esempio, mutazioni di sostituzione conservativa, (cioè, la sostituzione di uno o più aminoacidi con aminoacidi simili). Per esempio, la sostituzione conservativa si riferisce alla sostituzione di un aminoacido con un altro all'interno della stessa classe generale, per esempio, un aminoacido acido con un altro aminoacido acido, un aminoacido basico con un altro aminoacido basico, o un aminoacido neutro con un altro aminoacido neutro. Ciò che si intende

per sostituzione conservativa di aminoacidi è ben noto nell'arte.

In un altro esempio, la descrizione contempla sequenze polipeptidiche che hanno almeno il 90% o più di omologia di sequenza a una o più delle sequenze polipeptidiche di frammenti di anticorpi, regioni variabili e CDR di cui al presente documento. Più preferibilmente, la descrizione contempla sequenze polipeptidiche aventi almeno il 95% o più di omologia di sequenza, ancora più preferibilmente almeno il 98% o più di omologia di sequenza, e ancora più preferibilmente almeno il 99% o più di omologia di sequenza a una o più delle sequenze polipeptidiche di frammenti di anticorpi, regioni variabili e CDR qui esposte. I metodi per determinare l'omologia tra sequenze di acidi nucleici e aminoacidi sono ben noti a quelli di ordinaria abilità nell'arte.

In un altro esempio, la descrizione contempla ulteriormente gli omologhi polipeptidici sopra citati dei frammenti di anticorpi, delle regioni variabili e dei CDR di cui al presente documento che hanno anche attività anti-NGF. Esempi non limitanti di attività anti-NGF sono esposti qui.

In un altro esempio, la descrizione contempla inoltre la generazione e l'uso di anticorpi anti-idiotipi che

legano una qualsiasi delle sequenze di cui sopra. In un esempio, tale anticorpo anti-idiotipico potrebbe essere somministrato a un soggetto che ha ricevuto un anticorpo anti-NGF per modulare, ridurre o neutralizzare l'effetto dell'anticorpo anti-NGF. Tali anticorpi anti-idiotipi potrebbero anche essere utili per il trattamento di una malattia autoimmune caratterizzata dalla presenza di anticorpi anti-NGF. Un ulteriore uso esemplare di tali anticorpi anti-idiotipici è per la rilevazione degli anticorpi anti-NGF della presente invenzione, ad esempio per monitorare i livelli degli anticorpi anti-NGF presenti nel sangue o in altri fluidi corporei di un soggetto.

La presente descrizione contempla anche anticorpi anti-NGF che comprendono una qualsiasi delle sequenze polipeptidiche o polinucleotidiche qui descritte sostituite da una qualsiasi delle altre sequenze polinucleotidiche qui descritte. Per esempio, senza limitazione alcuna, la presente descrizione contempla anticorpi che comprendono la combinazione di qualsiasi sequenza di catena leggera variabile e catena pesante variabile descritta qui, e contempla inoltre anticorpi risultanti dalla sostituzione di qualsiasi sequenza CDR descritta qui con qualsiasi altra sequenza CDR descritta qui.

***Polinucleotidi che codificano i polipeptidi degli anticorpi anti-NGF***

*Anticorpo Abl*

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi Abl anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi Abl anticorpo. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 1:

**GCCCTTGTGATGACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAACATTTACAGCAATTTAGCCTGG  
TATCAACAGAGACCAGGGCAGCGTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAATCTG  
GATGCTGGGGTCCCATCGCGGTTTCAGAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACACTCT  
CACCATCAGCGACCTGGAGTGTGACGATGTTGGCACTTACTACTGTCAAAGTGCTTT  
TGATAGTGATAGTACTGAAAATACTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC  
GT (SEQ ID NO: 201).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleo-

tidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 2:

**GCCCTTGTGATGACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAACATTTACAGCAATTTAGCCTGG  
TATCAACAGAGACCAGGGCAGCGTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAATCTG  
GATGCTGGGGTCCCATCGCGGTTTCAGAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACACTCT  
CACCATCAGCGACCTGGAGTGTGACGATGTTGGCACTTACTACTGTCAAAGTGCTTT  
TGATAGTGATAGTACTGAAAATACTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC  
GTACGGTAGCGGCCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT  
CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG  
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCAACA  
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAA  
AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA  
GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 202).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 3:

**CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
CCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGCTTCTCCCTCAGTAGCTATGCAATGAGCTG  
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTACTAGTATTG  
GTAGCACAGTCTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCG  
ACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTT  
CTGTGCCAGAGGCTACGATGACTATGATGAGATGACCTACTTTAACATCTGGGGCCA  
GGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 203).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 4:

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
CCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGCTTCTCCCTCAGTAGCTATGCAATGAGCTG  
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGTCATTACTAGTATTG  
GTAGCACAGTCTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCG  
ACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTT  
CTGTGCCAGAGGCTACGATGACTATGATGAGATGACCTACTTTAACATCTGGGGCCA  
GGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT  
GGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA  
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGC  
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT  
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA  
AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCACTCTT  
CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC  
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGC  
CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG  
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAA  
CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA  
TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT  
CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA  
ACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGTCTCTTCTTCTTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA  
TGA (SEQ ID NO: 204).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 205; SEQ ID NO: 206; e SEQ ID NO: 207 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza

variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 1 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 2.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 208; SEQ ID NO: 209; e SEQ ID NO: 210 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 3 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 4.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 201

che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 1; il polinucleotide SEQ ID NO: 202 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 2; il polinucleotide SEQ ID NO: 203 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 3; il polinucleotide SEQ ID NO: 204 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 4; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità SEQ ID NO: 205; SEQ ID NO: 206; e SEQ ID NO: 207) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 1 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 2; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 208; SEQ ID NO: 209; e SEQ ID NO: 210) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 3 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 4.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab1, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab1 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consi-

stono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 202 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 2 e il polinucleotide SEQ ID NO: 204 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 4.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab1 dopo l'espressione dei polinucleotidi di lunghezza completa in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab1 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab1 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi

di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Anticorpo Ab2*

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab2 che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi anticorpo Ab2. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi aventi specificità di legame a NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 11:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
 GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAACATTTACAGCAACTTAGCCTG  
 GTATCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAATCT  
 GGATGCTGGAGTCCCATCAAGGTTCTCTGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACACTCT  
 CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTACTACTGCCAAAGTGCTTT  
 TGATAGTGATAGTACTGAAAACACTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAAC  
 GT (SEQ ID NO: 211).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 12:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
 GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAACATTTACAGCAACTTAGCCTG  
 GTATCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAATCT  
 GGATGCTGGAGTCCCATCAAGGTTCTCTGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACACTCT  
 CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTACTACTGCCAAAGTGCTTT  
 TGATAGTGATAGTACTGAAAACACTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAAC  
 GTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCAGCATCTGATGAGCAGTTGAAAT  
 CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG  
 TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACA  
 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA  
 AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA  
 GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 212).

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 13:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCGTCAGTAGCTATGCAATGAG  
 CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCGGAGTCATTACTAGTA  
 TTGGTAGCACAGTCTACGCGAGCAGCGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC  
 AATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCT  
 GTGTATTACTGTGCTAGAGGCTACGATGACTATGATGAGATGACCTACTTTAACATC  
 TGGGGCCAAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 213).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 14:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCGTCAGTAGCTATGCAATGAG  
 CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCGGAGTCATTACTAGTA  
 TTGGTAGCACAGTCTACGCGAGCAGCGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC  
 AATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCT  
 GTGTATTACTGTGCTAGAGGCTACGATGACTATGATGAGATGACCTACTTTAACATC  
 TGGGGCCAAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGT  
 CTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG  
 CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCT  
 GACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTTACTCCCT  
 CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA  
 ACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCT  
 TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC  
 GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC  
 TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA  
 ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA  
 GCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTG  
 GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA  
 TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC  
 CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT  
 CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG  
 AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT  
 ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC  
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT  
 CCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 214).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 215; SEQ ID NO: 216; e SEQ ID NO: 217 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 11 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 12.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 218; SEQ ID NO: 219; e SEQ ID NO: 220 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 13 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 14.

La descrizione contempla anche facoltativamente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 211 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 11; il polinucleotide SEQ ID NO: 212 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 12; il polinucleotide SEQ ID NO: 213 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 13; il polinucleotide SEQ ID NO: 214 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 14; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 215; SEQ ID NO: 216; e SEQ ID NO: 217) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 11 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 12; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 218; SEQ ID NO: 219; e SEQ ID NO: 220) della

sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 13 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 14.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab2, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab2 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 212 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 12 e il polinucleotide SEQ ID NO: 214 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 14.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab2

dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab2 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab2 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab3

La descrizione è inoltre diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab3 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA senza inibire sensibilmente l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi anticorpo Ab3. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi di anticorpo aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica

la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 21:

GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCATCGCCCGTGTCTGCAGCTATGGGA  
 GACACAGTCACCATCAAGTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
 TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAGGCTCCTGATCTATGATGCATCC  
 AATCTGCCATCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTC  
 ACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGC  
 GATTATGATGATGATGCTGATAATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
 ACGT (SEQ ID NO: 221).

In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 22:

GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCATCGCCCGTGTCTGCAGCTATGGGA  
 GACACAGTCACCATCAAGTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
 TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAGGCTCCTGATCTATGATGCATCC  
 AATCTGCCATCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTC  
 ACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGC  
 GATTATGATGATGATGCTGATAATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
 ACGTACGGTAGCGGCCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA  
 ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA  
 AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC  
 CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC  
 AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
 GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 222).

In un altro esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 23:

CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
 CCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGTAATGATCTGG  
 GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGAATCACTTGGAGTGCTGG  
 TACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGTCGA  
 CCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTTC  
 TGTGCCGGAGGTGGTGGTAGTATTTATGATATTTGGGGCCCGGGCACCCCTGGTCACC  
 GTCTCGAGC (SEQ ID NO: 223).

In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 24:

CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
 CCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGTAATGATCTGG  
 GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGAATCACTTGGAGTGCTGG  
 TACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGTCGA  
 CCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTTC  
 TGTGCCGGAGGTGGTGGTAGTATTTATGATATTTGGGGCCCGGGCACCCCTGGTCACC  
 GTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG  
 AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA  
 ACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCC  
 CGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT  
 CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC  
 ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCC  
 ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA  
 ACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGG  
 ACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG  
 GTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGT  
 GGTACGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT  
 GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCC  
 AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGAT  
 GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACA  
 TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCT  
 CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG  
 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC  
 AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA (SEQ ID NO:  
 224).

In un ulteriore esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 225; SEQ ID NO: 226; e SEQ ID NO: 227 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 21 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 22.

In un ulteriore esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 228; SEQ ID NO: 229; e SEQ ID NO: 230 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 23 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 24.

La descrizione contempla anche sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi qui

descritti per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 221 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 21; il polinucleotide SEQ ID NO: 222 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 22; il polinucleotide SEQ ID NO: 223 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 23; il polinucleotide SEQ ID NO: 224 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 24; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 225; SEQ ID NO: 226; e SEQ ID NO: 227) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 21 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 22; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 228; SEQ ID NO: 229; e SEQ ID NO: 230) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 23 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 24.

In un esempio preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab3, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab3 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 222 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 22 e il polinucleotide SEQ ID NO: 224 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 24.

Un altro esempio della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab3 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi

anti-NGF come Ab3 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab3 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

#### Anticorpo Ab4

La descrizione è inoltre diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab4 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA senza inibire sensibilmente l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi anticorpo Ab4. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza

polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ

ID NO: 31:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
 GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
 TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGGCATCC  
 ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTT  
 ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTGCAGGC  
 GGTTATAACCAGTAGTAGTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAA  
 ACGT (SEQ ID NO: 231).

In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leg-

gera di SEQ ID NO: 32:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
 GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
 TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGGCATCC  
 ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTT  
 ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTGCAGGC  
 GGTTATAACCAGTAGTAGTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAA  
 ACGTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA  
 ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA  
 AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC  
 CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC  
 AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
 GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 232).

In un altro esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 33:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAGCTATGTAATGAT  
 CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTACATCGGAATCACTTGGAGTG  
 CTGGTACATACTACGCGAGCAGTGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAT  
 TCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTG  
 TATTACTGTGCTGGAGGTGGTGGTAGTATCTATGATATTTGGGGCCAAGGGACCCTC  
 GTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 233).

In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 34:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAGCTATGTAATGAT  
 CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTACATCGGAATCACTTGGAGTG  
 CTGGTACATACTACGCGAGCAGTGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAT  
 TCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTGTG  
 TATTACTGTGCTGGAGGTGGTGGTAGTATCTATGATATTTGGGGCCAAGGGACCCTC  
 GTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC  
 TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT  
 CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA  
 CCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG  
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA  
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA  
 TGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC  
 CCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT  
 GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG  
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTA  
 CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT  
 ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC  
 AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA  
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA  
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC  
 CACGCCCTCCCGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT  
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG  
 CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ  
 ID NO: 234).

In un ulteriore esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 235; SEQ ID NO: 236; e SEQ ID NO: 237 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 31 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 32.

In un ulteriore esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 238; SEQ ID NO: 239; e SEQ ID NO: 240 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 33 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 34.

La descrizione contempla anche sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano i frammenti di anticorpi qui descritti. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 231 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 31; il polinucleotide SEQ ID NO: 232 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 32; il polinucleotide SEQ ID NO: 233 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 33; il polinucleotide SEQ ID NO: 234 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 34; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 235; SEQ ID NO: 236; e SEQ ID NO: 237) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 31 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 32; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 238; SEQ ID NO: 239; e SEQ ID NO: 240) della sequenza a

catena pesante variabile di SEQ ID NO: 33 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 34.

In un esempio preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab4, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab4 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 232 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 32 e il polinucleotide SEQ ID NO: 234 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 34.

Un altro esempio della descrizione, contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab4 dopo l'espressione

dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore come Ab4 o i suoi frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab4 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come *Pichia* diploide) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab5

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi Ab5 anticorpo per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi Ab5 anticorpo. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle con-

dizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 41:

**GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTACAGCAATTTAGCCTG  
GTATCAGCAGAGACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGATGCATCCACTCT  
GGAATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACACTC  
TCACCATCAGCGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCTTTACTACTGTCAACAGGGTT  
TTACTGTTAGTGATATTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC  
GT (SEQ ID NO: 241).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 42:

**GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTACAGCAATTTAGCCTG  
GTATCAGCAGAGACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGATGCATCCACTCT  
GGAATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACACTC  
TCACCATCAGCGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCTTTACTACTGTCAACAGGGTT  
TTACTGTTAGTGATATTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC  
GTACGGTAGCGGCCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT  
CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG  
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACA  
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA  
AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA  
GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 242).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in

alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 43:

**CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
CCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAACTATGCAGTGGGCTG  
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAATCATTGGTCGTAATG  
GTAACACATGGTACGCGAGCTGGGCAAGAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCG  
ACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAAGCGAGGACACGGCCACATATTT  
CTGTGCCAGAGGATATGGCCGTAGTGTTGCTTATTACGTCTTTAACATCTGGGGCCC  
AGGCACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 243).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 44:

CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
CCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAACTATGCAGTGGGCTG  
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAATCATTGGTCGTAATG  
GTAACACATGGTACGCGAGCTGGGCAAGAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCG  
ACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAAGCGAGGACACGGCCACATATTT  
CTGTGCCAGAGGATATGGCCGTAGTGTGCTTATTACGTCTTTAACATCTGGGGCCC  
AGGCACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCT  
GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA  
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC  
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC  
GTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT  
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA  
AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT  
CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCAC  
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGC  
CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG  
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAA  
CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA  
TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT  
CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA  
ACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC  
TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG  
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA  
TGA (SEQ ID NO: 244).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore frammenti aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 245; SEQ ID NO: 246; e SEQ ID NO: 247 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni

ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 41 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 42.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 248; SEQ ID NO: 249; e SEQ ID NO: 250 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 43 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 44.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono

in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 241 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 41; il polinucleotide SEQ ID NO: 242 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 42; il polinucleotide SEQ ID NO: 243 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 43; il polinucleotide SEQ ID NO: 244 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 44; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 245; SEQ ID NO: 246; e SEQ ID NO: 247) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 41 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 42; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 248; SEQ ID NO: 249; e SEQ ID NO: 250) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 43 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 44.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab5, i polinucleotidi che codifi-

cano l'anticorpo Ab5 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 242 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 42 e il polinucleotide SEQ ID NO: 244 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 44.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab5 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio opzionale della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab5 o frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab5 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come *Pichia diploide*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia*

adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Anticorpo Ab6*

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab6 aventi specificità di legame a NGF, che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo polipeptidi anticorpo Ab6. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore di polipeptidi aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTTACAGCAATCTTGCCTGG  
TATCAGCAGAAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCATCCACTCTG  
GAATCTGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACTCT  
CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTACTACTGCCAACAGGGTTT  
TACTGTTAGTGATATTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAAC  
GT (SEQ ID NO: 251).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 52:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTACAGCAATCTTGCCTGG  
TATCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCATCCACTCTG  
GAATCTGGAGTCCCATCAAGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTAACTCT  
CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTACTACTGCCAACAGGGTTT  
TACTGTTAGTGATATTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAAC  
GTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT  
CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG  
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACA  
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA  
AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA  
GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 252).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53:

**GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCGTCAGTAACTATGCAGTGGG  
CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAATCATTGGTTCGTA  
ATGGTAACACATGGTACGCGAGCTCTGCAAGAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGAC  
AATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCT  
GTGTATTACTGTGCTAGAGGATATGGCCGTAGTGTGCTTATTACGTCTTTAACATCT  
GGGGCCAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 253).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleo-

tidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 54:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAACTATGCAGTGGG  
CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAATCATTGGTCGTA  
ATGGTAACACATGGTACGCGAGCTCTGCAAGAGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC  
AATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCT  
GTGTATTACTGTGCTAGAGGATATGGCCGTAGTGTGCTTATTACGTCTTTAACATCT  
GGGGCCCAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT  
TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC  
TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCGTGGAACTCAGGCGCCCTG  
ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC  
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA  
CGTGAATCAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTT  
GTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
TCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT  
GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA  
CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC  
AGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC  
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC  
GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT  
GCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA  
AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG  
AACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC  
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC  
CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC  
GGGTAAATGA (SEQ ID NO: 254).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 255; SEQ ID NO: 256; e SEQ ID NO: 257 che corrispondono a polinucleotidi che

codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 52.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore frammenti aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 258; SEQ ID NO: 259; e SEQ ID NO: 260 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 54.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di

legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 251 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51; il polinucleotide SEQ ID NO: 252 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 52; il polinucleotide SEQ ID NO: 253 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53; il polinucleotide SEQ ID NO: 254 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 54; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 255; SEQ ID NO: 256; e SEQ ID NO: 257) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 52; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 258; SEQ ID NO: 259; e SEQ ID NO: 260) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 54.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto ri-

guarda l'anticorpo Ab6, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab6 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 252 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 52 e il polinucleotide SEQ ID NO: 254 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 54.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab6 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab6 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab6 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pi-*

chia) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Anticorpo Ab7*

La descrizione facoltativamente è inoltre diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab7 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. nei metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi anticorpo Ab7. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 61:

GCCGATGTTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGTCTCAACCTGTG  
 GGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGGACATTTATAACTTATTGGC  
 CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCAC  
 TCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACA  
 CTCTCACCATCAGCGGCCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAAACA  
 ATTATCTTGTTACTACTTATGGTGTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCA  
 AACGT (SEQ ID NO: 261).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 62:

GCCGATGTTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGTCTCAACCTGTG  
 GGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGGACATTTATAACTTATTGGC  
 CTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCAC  
 TCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACA  
 CTCTCACCATCAGCGGCCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAAACA  
 ATTATCTTGTTACTACTTATGGTGTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCA  
 AACGTACGGTAGCGGCCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA  
 AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA  
 AAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTG  
 ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAG  
 CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGGGCC  
 TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 262).

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 63:

CAGGAGCAGCTGAAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGAC  
 ACCCCTGACACTCACCTGTACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGCAATGAT  
 CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGATACATTGATACTG  
 AACTAGCGCATACTACGCGAGCTGGGTGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACC  
 TCGACCACGGTGGATCTCAAATCACTAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTA  
 TTTCTGTGCCAGATCTTATGCTGCTTATGGTGGTTATCCTGCTACTTTTGATCCCTGG  
 GGCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 263).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 64:

CAGGAGCAGCTGAAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGAC  
 ACCCCTGACACTCACCTGTACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGCAATGAT  
 CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGATACATTGATACTG  
 AACTAGCGCATACTACGCGAGCTGGGTGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACC  
 TCGACCACGGTGGATCTCAAATCACTAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTA  
 TTTCTGTGCCAGATCTTATGCTGCTTATGGTGGTTATCCTGCTACTTTTGATCCCTGG  
 GGCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC  
 CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG  
 GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCCCTGAC  
 CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG  
 CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT  
 GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTG  
 AAAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA  
 GTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG  
 GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG  
 GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
 TACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG  
 AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGA  
 GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC  
 CCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA  
 GGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA  
 CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG  
 CAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG  
 TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
 GTAAATGA (SEQ ID NO: 264).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 265; SEQ ID NO: 266; e SEQ ID NO: 267 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 61 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 62.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 268; SEQ ID NO: 269; e SEQ ID NO: 270 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 63 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 64.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 261 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 61; il polinucleotide SEQ ID NO: 262 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 62; il polinucleotide SEQ ID NO: 263 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 63; il polinucleotide SEQ ID NO: 264 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 64; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità SEQ ID NO: 265; SEQ ID NO: 266; e SEQ ID NO: 267) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 61 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 62; e polinucleotidi che codificano le regioni

che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 268; SEQ ID NO: 269; e SEQ ID NO: 270) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 63 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 64.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab7, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab7 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 262 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 62 e il polinucleotide SEQ ID NO: 264 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 64.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla

digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab7 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab7 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab7 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab8

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab8 aventi specificità di legame a NGF, che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo polipeptidi anticorpo Ab8. La descrizione è inoltre facoltativamente diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un

esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 71:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTGAGGACATTTACAACCTATTGGCCTGG  
TATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCACTCTG  
GCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTC  
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAACAACCTAT  
CTTGTTACTACTTATGGTGTGCTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACGT  
(SEQ ID NO: 271).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 72:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTGAGGACATTTACAACCTATTGGCCTGG  
TATCAGCAGAAACCAGGGAAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCACTCTG  
GCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTACACTCTC  
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAACAACCTAT  
CTTGTTACTACTTATGGTGTGCTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACGT  
ACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT  
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA  
CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA  
GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAG  
CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC  
TCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 272).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza poli-

nucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica

della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 73:

**CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCTTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGCAATGATC  
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGATAACATTGATACTGA  
TACTAGCGCATACTACGCAAGCAGTGTGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA  
ATTCCAAGAACACGCTGTACCTGCAAATGTCTAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCTAGATCTTATGCTGCTTATGGTGGTTATCCTGCTACTTTTGATC  
CCTGGGGCCAAGGTACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 273).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 74:

CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCTTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGCAATGATC  
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGATACATTGATACTGA  
TACTAGCGCATACTACGCAAGCAGTGTGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA  
ATTCCAAGAACACGCTGTACCTGCAAATGTCTAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCTAGATCTTATGCTGCTTATGGTGGTTATCCTGCTACTTTTGATC  
CCTGGGGCCAAGGTACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG  
TCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT  
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCC  
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC  
CTCAGCAGCGTGGTACCCTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATC  
TTGTGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC  
CGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC  
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC  
AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG  
AGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACT  
GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCC  
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC  
CCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGG  
TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG  
GAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC  
TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATG  
CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC  
TCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 274).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 275; SEQ ID NO: 276; e SEQ ID NO: 277 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza

variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 71 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 72.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 278; SEQ ID NO: 279; e SEQ ID NO: 280 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 73 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 74.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti po-

linucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 271 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 71; il polinucleotide SEQ ID NO: 272 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 72; il polinucleotide SEQ ID NO: 273 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 73; il polinucleotide SEQ ID NO: 274 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 74; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 275; SEQ ID NO: 276; e SEQ ID NO: 277) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 71 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 72; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 278; SEQ ID NO: 279; e SEQ ID NO: 280) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 73 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 74.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab8, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab8 a lunghezza intera comprendono,

o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 272 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 72 e il polinucleotide SEQ ID NO: 274 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 74.

Un altro esempio facoltativo della descrizione, contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab8 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab8 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab8 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia*

adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Anticorpo Ab9*

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso di polinucleotidi di cui sotto per produrre anticorpi Ab9 p esempio della descrizione, specificità a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprende la somministrazione a detto individuo polipeptidi anticorpo Ab9. La descrizione è inoltre facoltativamente diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ

ID NO: 81:

GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGAACATTGGTAGCTACTTAGCCTG  
GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCGAACTCCTGATCTACAGGGCGTCCACTCT  
GGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT  
CACCATCAGCGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTA  
TAATAGTGAGAATCTTGATAATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC  
GT (SEQ ID NO: 281).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 82:

**GCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGAACATTGGTAGCTACTTAGCCTG  
GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCGAACTCCTGATCTACAGGGCGTCCACTCT  
GGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT  
CACCATCAGCGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTA  
TAATAGTGAGAATCTTGATAATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAAC  
GTACGGTAGCGGCCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT  
CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG  
TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAA  
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA  
AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA  
GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 282).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 83:

**CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
CCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTATGTATTCAATGGGCTG  
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGATGGATTAGTTATGGTG  
GTACTGCATATTACGCGAGCTGGGCGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCG  
ACCACGGTGGAGCTGAAGATCACCAGTCCGACAATCGAGGACACGGCCACCTATTT  
CTGTGCCAGAGAGACTCCTGTTAATTATTATTGGACATTTGGGGCCAGGGGACCCT  
CGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 283).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleo-

tidica che codifica la sequenza polipeptidica della

catena pesante di SEQ ID NO: 84:

CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
 CCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTATGTATTCAATGGGCTG  
 GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGATGGATTAGTTATGGTG  
 GACTGTCATATTACGCGAGCTGGGCGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCG  
 ACCACGGTGGAGCTGAAGATCACCAGTCCGACAATCGAGGACACGGCCACCTATTT  
 CTGTGCCAGAGAGACTCCTGTTAATTATTATTTGGACATTTGGGGCCAGGGGACCCT  
 CGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC  
 CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT  
 TCCCGAACC GG T G A C G G T G T C G T G G A A C T C A G G C G C C C T G A C C A G C G G C G T G C A C  
 A C C T T C C C G G C T G T C C T A C A G T C C T C A G G A C T C T A C T C C C T C A G C A G C G T G G T G A C C  
 G T G C C C T C C A G C A G C T T G G G C A C C C A G A C C T A C A T C T G C A A C G T G A A T C A C A A G C C C  
 A G C A A C A C C A A G G T G G A C A A G A G A G T T G A G C C C A A A T C T T G T G A C A A A A C T C A C A C  
 A T G C C C A C C G T G C C C A G C A C C T G A A C T C C T G G G G G G A C C G T C A G T C T T C C T C T T C C C  
 C C C A A A A C C C A A G G A C A C C C T C A T G A T C T C C C G G A C C C C T G A G G T C A C A T G C G T G G T  
 G G T G G A C G T G A G C C A C G A A G A C C C T G A G G T C A A G T T C A A C T G G T A C G T G G A C G G C G  
 T G G A G G T G C A T A A T G C C A A G A C A A A G C C G C G G G A G G A G C A G T A C G C C A G C A C G T A  
 C C G T G T G G T C A G C G T C C T A C C G T C C T G C A C C A G G A C T G G C T G A A T G G C A A G G A G T  
 A C A A G T G C A A G G T C T C C A A C A A A G C C C T C C C A G C C C C C A T C G A G A A A A C C A T C T C C  
 A A A G C C A A A G G G C A G C C C C G A G A A C C A C A G G T G T A C A C C C T G C C C C C A T C C C G G G A  
 G G A G A T G A C C A A G A A C C A G G T C A G C C T G A C C T G C C T G G T C A A A G G C T T C T A T C C C A  
 G C G A C A T C G C C G T G G A G T G G G A G A G C A A T G G G C A G C C G G A G A A C A A C T A C A A G A C  
 C A C G C C T C C C G T G C T G G A C T C C G A C G G C T C C T T C T C C T C T A C A G C A A G C T C A C C G T  
 G G A C A A G A G C A G G T G G C A G C A G G G A A C G T C T T C T C A T G C T C C G T G A T G C A T G A G G  
 C T C T G C A C A A C C A C T A C A C G C A G A A G A G C C T C T C C C T G T C T C C G G G T A A A T G A (SEQ  
 ID NO: 284).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 285; SEQ ID NO: 286; e SEQ ID NO: 287 che corrispondono a polinucleotidi che

codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 81 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 82.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 288; SEQ ID NO: 289; e SEQ ID NO: 290 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 83 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 84.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specifi-

cità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 281 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 81; il polinucleotide SEQ ID NO: 282 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 82; il polinucleotide SEQ ID NO: 283 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 83; il polinucleotide SEQ ID NO: 284 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 84; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 285; SEQ ID NO: 286; e SEQ ID NO: 287) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 81 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 82; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 288; SEQ ID NO: 289; e SEQ ID NO: 290) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 83 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 84.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto ri-

guarda l'anticorpo Ab9, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab9 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 282 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 82 e il polinucleotide SEQ ID NO: 284 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 84.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab9 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab9 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab9 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pi-*

chia) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Anticorpo Ab10*

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab10 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo polipeptidi anticorpo Ab10. La descrizione è inoltre facoltativamente diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi di anticorpi aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 91:

**GCCTATGATATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG  
ACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTGAGAACATTGGTAGCTACTTAGCCTGGT  
ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATAGGGCTTCCACTCTGG  
CATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA  
CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAACAGGGTTACA  
ATAGTGAGAATCTTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACGT  
(SEQ ID NO: 291).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 92:

**GCCTATGATATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAG  
ACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTGAGAACATTGGTAGCTACTTAGCCTGGT  
ATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATAGGGCTTCCACTCTGG  
CATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCA  
CCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAACAGGGTTACA  
ATAGTGAGAATCTTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACGT  
ACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT  
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTA  
CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGA  
GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAG  
CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC  
TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 292).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 93:

**CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCTTCTGGATTCACCTTCAGTATGTATTCAATGGGC  
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGATGGATTAGTTATGG  
TGGTACTGCATACTACGCTAGCAGCGCTAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA  
ATTCCAAGAACACGCTGTACCTGCAAATGTCTAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
GTGTATTACTGTGCTAGAGAGACTCCTGTAAATTACTACTTGGACATTTGGGGCCAA  
GGTACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 293).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleo-

tidica che codifica la sequenza polipeptidica della

catena pesante di SEQ ID NO: 94:

**CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG  
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCTTCTGGATTACCTTCAGTATGTATTCAATGGGC  
 TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGATGGATTAGTTATGG  
 TGGTACTGCATACTACGCTAGCAGCGCTAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACA  
 ATTCCAAGAACACGCTGTACCTGCAAATGTCTAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT  
 GTGTATTACTGTGCTAGAGAGACTCCTGTTAATTACTACTTGGACATTTGGGGCCAA  
 GGTACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG  
 GCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA  
 GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG  
 GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG  
 TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC  
 ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA  
 ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC  
 CTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACA  
 TCGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT  
 GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCC  
 AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC  
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAAC  
 CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT  
 CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC  
 TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA  
 CAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCT  
 CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC  
 ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAT  
 GA (SEQ ID NO: 294).**

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 295; SEQ ID NO: 296; e SEQ ID NO: 297 che corrispondono a polinucleotidi che

codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 91 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 92.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 298; SEQ ID NO: 299; e SEQ ID NO: 300 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 93 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 94.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di

legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 291 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 91; il polinucleotide SEQ ID NO: 292 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 92; il polinucleotide SEQ ID NO: 293 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 93; il polinucleotide SEQ ID NO: 294 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 94; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità SEQ ID NO: 295; SEQ ID NO: 296; e SEQ ID NO: 297) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 91 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 92; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 298; SEQ ID NO: 299; e SEQ ID NO: 300) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 93 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 94.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto ri-

guarda l'anticorpo Ab10, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab10 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 292 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 92 e il polinucleotide SEQ ID NO: 294 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 94.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (per esempio, papaina) di Ab10 dopo l'espressione dei polinucleotidi di lunghezza completa in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab10 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab10 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come *Pichia di-*

ploide) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Anticorpo Ab11*

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab11 aventi specificità di legame a NGF, che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo polipeptidi anticorpo Ab11. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 101:

**GCATTCGAATTGACCCAGACTCCATCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAACATTGTTACCAATTTAGCCTGG  
TATCAACAGAAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCACTCTG  
GCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTC  
ACCATCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTATTTCTGTCAGAGCTATGAT  
GGTTTTAATAGTGCTGGGTTCCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAACGT (SEQ  
ID NO: 301).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 102:

**GCATTCGAATTGACCCAGACTCCATCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAACATTGTTACCAATTTAGCCTGG  
TATCAACAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCACTCTG  
GCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTC  
ACCATCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTATTTCTGTCAGAGCTATGAT  
GGTTTTAATAGTGCTGGGTTCCGGCGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAACGTACGGT  
AGCGGCCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC  
TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG  
GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG  
ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC  
TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC  
CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 302).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 103:

**CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
CCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTGGCTACGACATGAGCTG  
GGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAATACATCGGACTCATTAGTTATGATG  
GTAACACATACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCG  
ACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTT  
CTGTGCCAGAAGTCTTTATGCTGGTCTTAATGCTGGTATCGGACCGTTTAAACATCTG  
GGGCCAGGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 303).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleo-

tidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 104:

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
 CCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTGGCTACGACATGAGCTG  
 GGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGGCTGGAATACATCGGACTCATTAGTTATGATG  
 GTAACACATACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCG  
 ACCACGGTGGATCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTT  
 CTGTGCCAGAAGTCTTTATGCTGGTCCTAATGCTGGTATCGGACCGTTTAAACATCTG  
 GGGCCAGGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT  
 CCCCCTGGCAcCCTCCTCCaAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT  
 GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCCCTGA  
 CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA  
 GCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC  
 GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCAAATCTTG  
 TGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT  
 CAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG  
 AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC  
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC  
 AGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC  
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC  
 GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT  
 GCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCA  
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG  
 AACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGTCTCTTCTCCTCTAC  
 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC  
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC  
 GGGTAAATGA (SEQ ID NO: 304).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 305; SEQ ID NO: 306; e

SEQ ID NO: 307 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 101 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 102.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore frammenti aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 308; SEQ ID NO: 309; e SEQ ID NO: 310 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 103 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 104.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle con-

dizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 301 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 101; il polinucleotide SEQ ID NO: 302 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 102; il polinucleotide SEQ ID NO: 303 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 103; il polinucleotide SEQ ID NO: 304 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 104; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 305; SEQ ID NO: 306; e SEQ ID NO: 307) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 101 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 102; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 308; SEQ ID NO: 309; e SEQ ID NO: 310) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 103 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 104.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding)

aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab11, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab11 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 302 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 102 e il polinucleotide SEQ ID NO: 304 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 104.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab11 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio opzionale della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab11 o frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab11 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di

lievito (per esempio lievito diploide come *Pichia* diploide) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Anticorpo Ab12*

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab12 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo polipeptidi anticorpo Ab12. La descrizione è inoltre facoltativamente diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 111:

GCATTCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
 GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAACATTGTTACCAACTTAGCCTGG  
 TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCACTCTG  
 GCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTTAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC  
 ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAGAGCTATGAT  
 GGTTTCAATAGTGCTGGTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACGT (SEQ  
 ID NO: 311).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 112:

GCATTCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
 GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAACATTGTTACCAACTTAGCCTGG  
 TATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCACTCTG  
 GCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTTAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC  
 ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAGAGCTATGAT  
 GGTTTCAATAGTGCTGGTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGT  
 AGCGGCCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC  
 TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG  
 GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG  
 ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGAC  
 TACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCC  
 CGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 312).

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 113:

CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG  
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCTTCTGGATTCTCCCTCAGTGGCTACGACATGAG  
 CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGGACTCATTAGTTATG  
 ATGGTAACACATACTACGCGACCTCCGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC  
 AATTCCAAGAACACGCTGTACCTGCAAATGTCTAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC  
 TGTGTATTACTGTGCTAGAAGTCTTTATGCTGGTCCTAATGCTGGTATCGGACCGTTT  
 AACATCTGGGGCCAAGGTACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 313).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 114:

CAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG  
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCTTCTGGATTCTCCCTCAGTGGCTACGACATGAG  
 CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGGGACTCATTAGTTATG  
 ATGGTAACACATACTACGCGACCTCCGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC  
 AATTCCAAGAACACGCTGTACCTGCAAATGTCTAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGC  
 TGTGTATTACTGTGCTAGAAGTCTTTATGCTGGTCCTAATGCTGGTATCGGACCGTTT  
 AACATCTGGGGCCAAGGTACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCC  
 ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT  
 GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAG  
 GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT  
 ACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCGTGCCTCCTCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACA  
 TCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCC  
 AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG  
 GGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG  
 ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA  
 GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG  
 AGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG  
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC  
 CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT  
 ACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC  
 CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA  
 GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT  
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT  
 CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC  
 TGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 314).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 315; SEQ ID NO: 316; e SEQ ID NO: 317 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 111 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 112.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 318; SEQ ID NO: 319; e SEQ ID NO: 320 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 113 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 114.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 311 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 111; il polinucleotide SEQ ID NO: 312 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 112; il polinucleotide SEQ ID NO: 313 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 113; il polinucleotide SEQ ID NO: 314 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 114; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 315; SEQ ID NO: 316; e SEQ ID NO: 317) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 111 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 112; e polinucleotidi che codificano le regioni

che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 318; SEQ ID NO: 319; e SEQ ID NO: 320) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 113 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 114.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab12, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab12 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 312 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 112 e il polinucleotide SEQ ID NO: 314 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 114.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla

digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab12 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab12 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab12 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab13

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab13 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo polipeptidi anticorpo Ab13. La descrizione è inoltre facoltativamente diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi di anticorpi aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in al-

ternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 121:

**GCCGCCGTGCTGACCCAGACTCCATCTCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCAGCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACAAGGCATCC  
ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCGGTGGATCTGGGACAGATTTT  
ACTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGCTGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGC  
GGTTATAACCAGTAGTAGTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
ACGT (SEQ ID NO: 321).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 122:

**GCCGCCGTGCTGACCCAGACTCCATCTCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCAGCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACAAGGCATCC  
ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCGGTGGATCTGGGACAGATTTT  
ACTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGCTGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGC  
GGTTATAACCAGTAGTAGTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
ACGTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA  
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA  
AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA  
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTA (SEQ ID NO: 322).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 123:

CAGTCGGTGGAGGCGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
CCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTACCTACTGGATGAGCTG  
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGACATTTATTTTAGTA  
ATGAAGAAACAAACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTTACCATCTCCAAAACC  
TCGACCACGGTGGATCTGAATGTCATCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTA  
TTTCTGTGCCAGAGGTTCTCCTGATGTTGATATTGGTATAGATATGTGGGGCCCCGGG  
CACCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 323).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 124:

CAGTCGGTGGAGGCGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
CCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTACCTACTGGATGAGCTG  
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGACATTTATTTTAGTA  
ATGAAGAAACAAACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTTACCATCTCCAAAACC  
TCGACCACGGTGGATCTGAATGTCATCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTA  
TTTCTGTGCCAGAGGTTCTCCTGATGTTGATATTGGTATAGATATGTGGGGCCCCGGG  
CACCTCGTCACCGTCTCGAGCGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC  
ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG  
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC  
GTGCACACCTTCCGGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG  
GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC  
AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAC  
TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCT  
CTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG  
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG  
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAG  
CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA  
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA  
TCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCC  
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA  
TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACA  
AGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCA  
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT  
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG  
A (SEQ ID NO: 324).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 325; SEQ ID NO: 326; e SEQ ID NO: 327 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarietà (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 121 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 122.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 328; SEQ ID NO: 329; e SEQ ID NO: 330 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarietà (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 123 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 124.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 321 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 121; il polinucleotide SEQ ID NO: 322 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 122; il polinucleotide SEQ ID NO: 323 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 123; il polinucleotide SEQ ID NO: 324 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 124; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 325; SEQ ID NO: 326; e SEQ ID NO: 327) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 121 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 122; e polinucleotidi che codificano le regioni

che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 328; SEQ ID NO: 329; e SEQ ID NO: 330) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 123 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 124.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab13, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab13 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 322 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 122 e il polinucleotide SEQ ID NO: 324 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 124.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla

digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab13 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab13 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab13 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

#### Anticorpo Ab14

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab14 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo polipeptidi anticorpo Ab14. La descrizione è inoltre facoltativamente diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi di anticorpi aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in al-

ternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 131:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGGCATCC  
ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTT  
ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTGCAGGC  
GGTTATAACCAGTAGTAGTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAA  
ACGT (SEQ ID NO: 331).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 132:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGGCATCC  
ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTT  
ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTGCAGGC  
GGTTATAACCAGTAGTAGTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAA  
ACGTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA  
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA  
AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA  
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 332).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 133:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCGTCAGTACCTACTGGATGAG  
CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGACATTTACTTTA  
GTAATGAAGAAACAAACTACGCGAGCAGCGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGA  
GACAATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACAC  
TGCTGTGTATTACTGTGCTAGAGGTTCTCCTGATGTTGATATTGGTATAGATATGTGG  
GGCCAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 333).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 134:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCGTCAGTACCTACTGGATGAG  
CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGACATTTACTTTA  
GTAATGAAGAAACAAACTACGCGAGCAGCGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGA  
GACAATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACAC  
TGCTGTGTATTACTGTGCTAGAGGTTCTCCTGATGTTGATATTGGTATAGATATGTGG  
GGCCAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC  
CCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG  
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC  
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAG  
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT  
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTG  
ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA  
GTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG  
GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG  
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
TACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTG  
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGA  
GAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC  
CCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA  
GGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA  
CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG  
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG  
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
GTAAATGA (SEQ ID NO: 334).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 335; SEQ ID NO: 336; e SEQ ID NO: 337 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 131 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 132.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 338; SEQ ID NO: 339; e SEQ ID NO: 340 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 133 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 134.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 331 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 131; il polinucleotide SEQ ID NO: 332 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 132; il polinucleotide SEQ ID NO: 333 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 133; il polinucleotide SEQ ID NO: 334 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 134; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 335; SEQ ID NO: 336; e SEQ ID NO: 337) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 131 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 132; e polinucleotidi che codificano le regioni

che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 338; SEQ ID NO: 339; e SEQ ID NO: 340) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 133 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 134.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab14, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab14 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 332 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 132 e il polinucleotide SEQ ID NO: 334 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 134.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla

digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab14 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab14 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab14 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab15

La descrizione è inoltre diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab15 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA senza inibire sensibilmente l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi anticorpo Ab15. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un esempio

della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 141:

GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCATCGCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
 GACACAGTCACCATCAAGTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
 TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGATGCATCC  
 AATCTGCCATCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTC  
 ACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGC  
 GATTATGATGATGATACTGATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
 ACGT (SEQ ID NO: 341).

In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 142:

GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCATCGCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
 GACACAGTCACCATCAAGTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
 TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGATGCATCC  
 AATCTGCCATCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTC  
 ACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGC  
 GATTATGATGATGATACTGATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
 ACGTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA  
 ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA  
 AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA  
 CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
 AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
 GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 342).

In un altro esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica

che codifica la sequenza polipeptidica della catena

pesante variabile di SEQ ID NO: 143:

CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
CCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCTATGCAATGATCTG  
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGAATCATTGGAGTGGTG  
GCACCTACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCGACC  
ACGGTGGATCTGCAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACGCGGCCACCTATTTCTGT  
GCCGCAGGTGGTGGTAGTATTTATGATGTTTGGGGCCCGGGCACCCTGGTCACCGTC  
TCGAGC (SEQ ID NO: 343).

In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 144:

CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGTTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
CCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCTATGCAATGATCTG  
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGAATCATTTGGAGTGGTG  
GCACCTACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACC  
ACGGTGGATCTGCAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACGCGGCCACCTATTTCTGT  
GCCGCAGGTGGTGGTAGTATTTATGATGTTTGGGGCCCGGGCACCCCTGGTCACCGTC  
TCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC  
ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC  
GGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG  
CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA  
GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC  
AAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACC  
GTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCC  
CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT  
GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC  
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTC  
AGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA  
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAG  
GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACC  
AAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC  
GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGT  
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAG  
GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA  
CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ ID NO: 344).

In un ulteriore esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 345; SEQ ID NO: 346; e SEQ ID NO: 347 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena

leggera di SEQ ID NO: 141 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 142.

In un ulteriore esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 348; SEQ ID NO: 349; e SEQ ID NO: 350 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 143 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 144.

La descrizione contempla anche sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi

che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 341 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 141; il polinucleotide SEQ ID NO: 342 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 142; il polinucleotide SEQ ID NO: 343 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 143; il polinucleotide SEQ ID NO: 344 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 144; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 345; SEQ ID NO: 346; e SEQ ID NO: 347) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 141 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 142; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 348; SEQ ID NO: 349; e SEQ ID NO: 350) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 143 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 144.

In un esempio preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab15, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab15 a lunghezza intera comprendono, o in al-

ternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 342 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 142 e il polinucleotide SEQ ID NO: 344 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 144.

Un altro esempio della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab15 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab15 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab15 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

Anticorpo Ab16

La descrizione è inoltre diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpi Ab16 per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA senza inibire sensibilmente l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi anticorpi Ab16. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 151:

```
GCCCTGGTGATGACCCAGACTCCATCCTCCACGTCTGAACCAGTGGGA  
GGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCTAGTCAGAATATTGGTAACGACCTATCCTGG  
TATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCGAGCTCCTAATCTATTCTACATCCAAACTG  
GCAACTGGGGTCCCAAAGCGGTTTCAGTGGCAGCAGATCTGGGACACAGTTCACTCT  
CACCATCAGCGACCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGTGTTTA  
TAGTTATATTAGTGATGATGGTAATGCTTTCCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
ACGT (SEQ ID NO: 351).
```

In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 152:

**GCCCTGGTGATGACCCAGACTCCATCCTCCACGTCTGAACCAGTGGGA  
GGCACAGTCACCATCAATTGCCAGGCTAGTCAGAATATTGGTAACGACCTATCCTGG  
TATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCGAGCTCCTAATCTATTCTACATCCAAACTG  
GCAACTGGGGTCCCAAAGCGGTTTCAGTGGCAGCAGATCTGGGACACAGTTCACTCT  
CACCATCAGCGACCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGTGTTTA  
TAGTTATATTAGTGATGATGGTAATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
ACGTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA  
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA  
AGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAGGAGAGTGTCA  
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 352).**

In un altro esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 153:

**CAGTCGGTGGAGGAGTTCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACC  
CCTGACACTCACCTGCACCGTCTCTGGATTCTCCCTCAATAACTATGCAATGACCTG  
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGGATCATTGGTAGTATTG  
GTACCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCTTCATCTCCAAAACCTCGA  
CCTGTGGATCTGAAAATCATTAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCT  
GTGCCAGAGATGCTGGCGTTACTGTTGATGGTTATGGCTACTACTTTAACATCTGGG  
GCCAGGCACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 353).**

In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che

codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 154:

CAGTCGGTGGAGGAGTTCGGGGGTGCGCTGGTCACGCCTGGGACACC  
 CCTGACACTCACCTGCACCGTCTCTGGATTCTCCCTCAATAACTATGCAATGACCTG  
 GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGGATCATTGGTAGTATTG  
 GTACCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCTTCATCTCCAAAACCTCGA  
 CCACTGTGGATCTGAAAATCATTAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCT  
 GTGCCAGAGATGCTGGCGTTACTGTTGATGGTTATGGCTACTACTTTAACATCTGGG  
 GCCAGGCACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCC  
 CCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG  
 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC  
 AGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGC  
 AGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG  
 AATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA  
 CAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG  
 TCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG  
 TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG  
 TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT  
 ACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA  
 ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG  
 AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC  
 CCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG  
 GCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC  
 AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC  
 AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT  
 GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG  
 TAAATGA (SEQ ID NO: 354).

In un ulteriore esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 355; SEQ ID NO: 356; e SEQ ID NO: 357 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni

che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 151 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 152.

In un ulteriore esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 358; SEQ ID NO: 359; e SEQ ID NO: 360 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 153 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 154.

La descrizione contempla anche sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF com-

prendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 351 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 151; il polinucleotide SEQ ID NO: 352 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 152; il polinucleotide SEQ ID NO: 353 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 153; il polinucleotide SEQ ID NO: 354 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 154; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 355; SEQ ID NO: 356; e SEQ ID NO: 357) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 151 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 152; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 358; SEQ ID NO: 359; e SEQ ID NO: 360) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 153 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 154.

In un esempio preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'an-

ticorpo Ab16, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab16 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 352 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 152 e il polinucleotide SEQ ID NO: 354 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 154.

Un altro esempio della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab16 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab16 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab16 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di

lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Anticorpo Ab17*

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab17 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA senza inibire sensibilmente l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi anticorpo Ab17. La descrizione è inoltre facoltativamente diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 161:

GCCATCGAAATGACCCAGACTCCATTCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
 GGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGACCATTAGCAACTACTTAGCCTG  
 GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAATCT  
 GGAATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT  
 CACCATCAGCGACCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTA  
 TACTATCAGTAATGTTGATAACAATGTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
 ACGT (SEQ ID NO: 361).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 162:

GCCATCGAAATGACCCAGACTCCATTCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
 GGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGACCATTAGCAACTACTTAGCCTG  
 GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAATCT  
 GGAATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT  
 CACCATCAGCGACCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTA  
 TACTATCAGTAATGTTGATAACAATGTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
 ACGTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA  
 ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA  
 AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA  
 CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
 AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
 GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 362).

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 163:

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGGGATC  
 CCTGACACTCACCTGCGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCACTGGCTACAACCTGGTCTG  
 GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATTCATTAGTTATGGTG  
 ATACCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCG  
 ACCACGGTGACTCTGACGATCACCGATCTGCAACCTTCAGACACGGGCACCTATTTTC  
 TGTGCCAGAGAGACTGCTAATACTTATGATTATGGCATCTGGGGCCCAGGCACCCTC  
 GTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 363).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 164:

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGGGATC  
 CCTGACACTCACCTGCGCAGCCTCTGGATTCTCCCTCACTGGCTACAACCTGGTCTG  
 GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATTCATTAGTTATGGTG  
 ATACCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAAACCTCG  
 ACCACGGTGACTCTGACGATCACCGATCTGCAACCTTCAGACACGGGCACCTATTTTC  
 TGTGCCAGAGAGACTGCTAATACTTATGATTATGGCATCTGGGGCCCAGGCACCCTC  
 GTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC  
 TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT  
 CCCCCAACCGGTGACGGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACA  
 CCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG  
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCA  
 GCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA  
 TGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC  
 CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT  
 GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG  
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGCACGTA  
 CCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT  
 ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC  
 AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGA  
 GGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA  
 GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGAC  
 CACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGT  
 GGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG  
 CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ  
 ID NO: 364).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 365; SEQ ID NO: 366; e SEQ ID NO: 367 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 161 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 162.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 368; SEQ ID NO: 369; e SEQ ID NO: 370 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 163 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 164.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 361 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 161; il polinucleotide SEQ ID NO: 362 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 162; il polinucleotide SEQ ID NO: 363 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 163; il polinucleotide SEQ ID NO: 364 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 164; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 365; SEQ ID NO: 366; e SEQ ID NO: 367) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 161 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 162; e polinucleotidi che codificano le regioni

che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 368; SEQ ID NO: 369; e SEQ ID NO: 370) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 163 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 164.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab17, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab17 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 362 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 162 e il polinucleotide SEQ ID NO: 364 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 164.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere pro-

dotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab17 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab17 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab17 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab18

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab18 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo polipeptidi anticorpo Ab18. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un esempio opzionale

della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 171:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGTTCAGGCTAGTCAGACCATTAGCAACTACTTAGCCTGG  
TATCAGCAGAAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAATCTG  
GAATCTGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGAACAGAATTCACTCTC  
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGGGTTAT  
ACTATCAGTAATGTTGATAACAATGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAA  
ACGT (SEQ ID NO: 371).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 172:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGTTCAGGCTAGTCAGACCATTAGCAACTACTTAGCCTGG  
TATCAGCAGAAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAATCTG  
GAATCTGGAGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGAACAGAATTCACTCTC  
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGGGTTAT  
ACTATCAGTAATGTTGATAACAATGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAA  
ACGTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA  
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA  
AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA  
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 372).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza poli-

nucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 173:

**GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTGGCTACAACCTGGT  
CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGATTCATTAGTTATG  
GTGATACCACATACTACGCTAGCTCTGCTAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACA  
ATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTG  
TGTATTACTGTGCTAGAGAGACTGCTAATACTTATGATTATGGCATCTGGGGCCAAG  
GGACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 373).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 174:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTGGCTACAACCTTGGT  
CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTCGATTATTAGTTATG  
GTGATACCACATACTACGCTAGCTCTGCTAAAGGCCGATTACCCATCTCCAGAGACA  
ATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCTG  
TGTATTACTGTGCTAGAGAGACTGCTAATACTTATGATTATGGCATCTGGGGCCAAG  
GGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG  
CACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG  
GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGG  
CGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT  
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA  
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAA  
CTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC  
TCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAT  
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG  
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCA  
GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA  
AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACC  
ATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC  
CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT  
ATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC  
AAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC  
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA  
TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG  
A (SEQ ID NO: 374).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 375; SEQ ID NO: 376; e SEQ ID NO: 377 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementa-

rità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 171 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 172.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 378; SEQ ID NO: 379; e SEQ ID NO: 380 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 173 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 174.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa

consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 371 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 171; il polinucleotide SEQ ID NO: 372 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 172; il polinucleotide SEQ ID NO: 373 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 173; il polinucleotide SEQ ID NO: 374 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 174; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 375; SEQ ID NO: 376; e SEQ ID NO: 377) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 171 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 172; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 378; SEQ ID NO: 379; e SEQ ID NO: 380) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 173 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 174.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di

legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab18, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab18 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 372 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 172 e il polinucleotide SEQ ID NO: 374 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 174.

Un altro esempio facoltativo della descrizione, contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione, descritto qui (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab18 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab18 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab18 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide

Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

Anticorpo Ab19

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab19 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75. nei metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi anticorpo Ab19. La descrizione è inoltre facoltativamente diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 181:

GCCGCCGTGCTGACCCAGACTCCATCTCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCAGCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAAGAACAACACTATTTA  
TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACAAGGCTTCC  
ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC  
ACTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGCTGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGC  
GGTTATAGTAGTAGTAGTGATAATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
ACGT (SEQ ID NO: 381).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 182:

GCCGCCGTGCTGACCCAGACTCCATCTCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGA  
GGCACAGTCAGCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAAGAACAACACTATTTA  
TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACAAGGCTTCC  
ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC  
ACTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGCTGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGC  
GGTTATAGTAGTAGTAGTGATAATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA  
ACGTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA  
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA  
AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCA  
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 382).

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 183:

CAGTCGGTGGAGGCGTCCGGGGGTCGTCTGGTCATGCCTGGAGGATCC  
 CTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTACCTACTGGATGTCCTGG  
 GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGACATTTATTTAGTAA  
 TGAGGAAACAAACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTTACCATCTCCAAAACCT  
 CGACCACGGTGGATCTGAATGTCATCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTAT  
 TTCTGTGCAAGAGGTTCTCCTGATGTTGAGATTGCTATAGATATGTGGGGCCAGGGC  
 ACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 383).

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 184:

CAGTCGGTGGAGGCGTCCGGGGGTCGTCTGGTCATGCCTGGAGGATCC  
 CTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTACCTACTGGATGTCCTGG  
 GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAGACATTTATTTAGTAA  
 TGAGGAAACAAACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTTACCATCTCCAAAACCT  
 CGACCACGGTGGATCTGAATGTCATCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTAT  
 TTCTGTGCAAGAGGTTCTCCTGATGTTGAGATTGCTATAGATATGTGGGGCCAGGGC  
 ACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA  
 CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGA  
 CTA CT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCGT  
 GCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT  
 GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA  
 AGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACT  
 CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC  
 TCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA  
 CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACGCCAGC  
 ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG  
 GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT  
 CTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCC  
 GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT  
 CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACA  
 AGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCA  
 CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT  
 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG  
 A (SEQ ID NO: 384).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 385; SEQ ID NO: 386; e SEQ ID NO: 387 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 181 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 182.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 388; SEQ ID NO: 389; e SEQ ID NO: 390 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 183 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 184.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 381 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 181; il polinucleotide SEQ ID NO: 382 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 182; il polinucleotide SEQ ID NO: 383 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 183; il polinucleotide SEQ ID NO: 384 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 184; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 385; SEQ ID NO: 386; e SEQ ID NO: 387) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 181 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 182; e polinucleotidi che codificano le regioni

che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 388; SEQ ID NO: 389; e SEQ ID NO: 390) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 183 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 184.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab19, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab19 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 382 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 182 e il polinucleotide SEQ ID NO: 384 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 184.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In una forma di realizzazione opzionale dell'invenzione descritta qui (infra), i frammenti Fab possono

essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab19 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab19 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab19 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

#### Anticorpo Ab20

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab20 per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF, che inibisce l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75, in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi anticorpo Ab20. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi aventi specificità di legame a NGF. In un esempio opzionale

della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 191:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGGCATCC  
ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTT  
ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTGCAGGC  
GGTTATAACCAGTAGTAGTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAA  
ACGT (SEQ ID NO: 391).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 192:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAAGAACAACACTACTTA  
TCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTCCCTAAGCTCCTGATCTATAAAGGCATCC  
ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCTCGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTT  
ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTGCAGGC  
GGTTATAACCAGTAGTAGTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAA  
ACGTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA  
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAA  
AGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCA  
CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC  
AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCT  
GAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 392).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza poli-

nucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica

della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 193:

**GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTACCTACTGGATGAG  
CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAGACATTTACTTTA  
GTAATGAAGAAACAAACTACGCGACCAGCGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGA  
GACAATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACAC  
TGCTGTGTATTACTGTGCTAGAGGTTCTCCTGATGTTGAGATTGCTATAGATATGTGG  
GGCCAAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 393).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 194:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCGTCAGTACCTACTGGATGAG  
CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGAGACATTTACTTTA  
GTAATGAAGAAACAAACTACGCGACCAGCGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAGA  
GACAATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACAC  
TGCTGTGTATTACTGTGCTAGAGGTTCTCCTGATGTTGAGATTGCTATAGATATGTGG  
GGCCAAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC  
CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG  
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC  
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAG  
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT  
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTG  
ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA  
GTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG  
GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG  
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
TACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTG  
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGA  
GAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC  
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA  
GGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA  
CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG  
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG  
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG  
GTAAATGA (SEQ ID NO: 394).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 395; SEQ ID NO: 396; e SEQ ID NO: 397 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza

variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 191 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 192.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 398; SEQ ID NO: 399; e SEQ ID NO: 400 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 193 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 194.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti po-

linucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 391 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 191; il polinucleotide SEQ ID NO: 392 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 192; il polinucleotide SEQ ID NO: 393 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 193; il polinucleotide SEQ ID NO: 394 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 194; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 395; SEQ ID NO: 396; e SEQ ID NO: 397) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 191 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 192; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 398; SEQ ID NO: 399; e SEQ ID NO: 400) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 193 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 194.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda l'anticorpo Ab20, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab20 a lunghezza intera comprendono,

o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 392 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 192 e il polinucleotide SEQ ID NO: 394 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 194.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab20 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab20 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab20 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide *Pichia*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia*

adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

*Anticorpo Ab21*

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi anticorpo Ab21 aventi specificità di legame a NGF, che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e l'associazione di NGF con p75 in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi anticorpo Ab21. La descrizione è inoltre facoltativamente diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTTACAGCAATCTTGCCTGG  
TATCAGCAGAAACCAGGAAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCATCCACTCTG  
GAATCTGGAGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACACTCT  
CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTGCAACTTACTACTGCCAACAGGGTTT  
TACTGTTAGTGATATTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAAC  
GT (SEQ ID NO: 251).**

In un esempio della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono opzionalmente, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 401:

**GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTACAGCAATCTTGCCTGG  
TATCAGCAGAAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCATCCACTCTG  
GAATCTGGAGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACACTCT  
CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTACTACTGCCAACAGGGTTT  
TACTGTTAGTGATATTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAAC  
GTACGGTAGCGGCCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT  
CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG  
TACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAA  
GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA  
AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA  
GCTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 403).**

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53:

**GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAACTATGCAGTGGG  
CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGGAATCATTGGTCGTA  
ATGGTAACACATGGTACGCGAGCTCTGCAAGAGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC  
AATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCT  
GTGTATTACTGTGCTAGAGGATATGGCCGTAGTGTTGCTTATTACGTCTTTAACATCT  
GGGGCCCAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGC (SEQ ID NO: 253).**

In un esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleo-

tidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 402:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAACTATGCAGTGGG  
 CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCCGGAATCATTGGTTCGTA  
 ATGGTAACACATGGTACGCGAGCTCTGCAAGAGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC  
 AATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCT  
 GTGTATTACTGTGCTAGAGGATATGGCCGTAGTGTTGCTTACTACGTCTTTAACATCT  
 GGGGCCCAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT  
 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC  
 TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTG  
 ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC  
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA  
 CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGCGAGAGTTGAGCCCAAATCTT  
 GTGACAAAACCTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCG  
 TCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT  
 GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA  
 CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC  
 AGTACGCCAGCACGTACCGTGTGGTCCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC  
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC  
 GAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT  
 GCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCA  
 AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG  
 AACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC  
 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC  
 CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC  
 GGGTAAATGA (SEQ ID NO: 404).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 255; SEQ ID NO: 256; e SEQ ID NO: 257 che corrispondono a polinucleotidi che

codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 401.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono, in una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 258; SEQ ID NO: 259; e SEQ ID NO: 260 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 402.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di

legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 251 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51; il polinucleotide SEQ ID NO: 403 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 401; il polinucleotide SEQ ID NO: 253 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53; il polinucleotide SEQ ID NO: 404 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 402; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 255; SEQ ID NO: 256; e SEQ ID NO: 257) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 401; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 258; SEQ ID NO: 259; e SEQ ID NO: 260) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 402.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding) aventi specificità di legame per NGF. Per quanto ri-

guarda l'anticorpo Ab21, i polinucleotidi che codificano l'anticorpo Ab21 a lunghezza intera comprendono, o in alternativa consistono, nel polinucleotide SEQ ID NO: 403 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 401 e il polinucleotide SEQ ID NO: 404 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 402.

Un altro esempio facoltativo della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio opzionale della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti dalla digestione enzimatica (ad esempio, papaina) di Ab21 dopo l'espressione dei polinucleotidi full-length in un ospite adatto. In un altro esempio della descrizione, gli anticorpi anti-NGF come Ab21 o i loro frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Ab21 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come diploide

Pichia) e altri ceppi di lievito. Le specie di Pichia adatte includono, ma non sono limitate a, Pichia pastoris.

Frammento di anticorpo Fab2

La descrizione è inoltre facoltativamente diretta all'uso dei polinucleotidi indicati di seguito per produrre polipeptidi del frammento di anticorpo Fab2 che inibiscono l'associazione di NGF con TrkA e p75 per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore aventi specificità di legame a NGF in metodi di trattamento del dolore in un individuo che comprendono la somministrazione a detto individuo di polipeptidi Ab1 anticorpo. La descrizione è inoltre diretta a polinucleotidi che codificano polipeptidi di frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore che hanno specificità di legame con NGF. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi Fab della descrizione comprendono, o in alternativa consistono nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena leggera di SEQ ID NO: 407:

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGA  
 GACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTACAGCAATCTTGCCTGG  
 TATCAGCAGAAAACCAGGAAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCATCCACTCTG  
 GAATCTGGAGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACACTCT  
 CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTACTACTGCCAACAGGGTTT  
 TACTGTTAGTGATATTGATAATGCTTTTCGGCGGAGGAACCAAGGTGGAAATCAAAC  
 GTACGGTAGCGGCCCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT  
 CTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG  
 TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACA  
 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA  
 AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA  
 GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (SEQ ID NO: 409).

In un altro esempio opzionale della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, nella seguente sequenza polinucleotidica che codifica la sequenza polipeptidica della catena pesante di SEQ ID NO: 408:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGG  
 GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCGTCAGTAACTATGCAGTGGG  
 CTGGGTCCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGGAATCATTGGTCGTA  
 ATGGTAACACATGGTACGCGAGCTCTGCAAGAGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC  
 AATTCCAAGAACACCCTGTATCTTCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACTGCT  
 GTGTATTACTGTGCTAGAGGATATGGCCGTAGTGTTGCTTACTACGTCTTTAACATCT  
 GGGGCCCAGGGACCCTCGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCT  
 TCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC  
 TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG  
 ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC  
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA  
 CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGCGAGAGTTGAGCCCAAATCTT  
 GTGACAAAACACTACTAG (SEQ ID NO: 410).

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi Fab aventi specificità di legame a NGF comprendono una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 255; SEQ ID NO: 256; e SEQ ID NO: 257

che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena leggera di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 409.

In un ulteriore esempio facoltativo della descrizione, i polinucleotidi che codificano i frammenti di anticorpi Fab per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore con specificità di legame a NGF comprendono una o più delle sequenze polinucleotidiche di SEQ ID NO: 258; SEQ ID NO: 259; e SEQ ID NO: 260 che corrispondono a polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili) della sequenza variabile della catena pesante di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 410.

La descrizione contempla anche opzionalmente sequenze polinucleotidiche che includono una o più delle sequenze polinucleotidiche che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore qui descritte. In un esempio della descrizione, i polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle con-

dizioni associate al dolore che hanno specificità di legame a NGF comprendono, o in alternativa consistono in uno, due, tre o più, compresi tutti i seguenti polinucleotidi che codificano frammenti di anticorpi: il polinucleotide SEQ ID NO: 251 che codifica la sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51; il polinucleotide SEQ ID NO: 409 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 407; il polinucleotide SEQ ID NO: 253 che codifica la sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53; il polinucleotide SEQ ID NO: 410 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 408; polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 255; SEQ ID NO: 256; e SEQ ID NO: 257) della sequenza a catena leggera variabile di SEQ ID NO: 51 o una sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 407; e polinucleotidi che codificano le regioni che determinano la complementarità (SEQ ID NO: 258; SEQ ID NO: 259; e SEQ ID NO: 260) della sequenza a catena pesante variabile di SEQ ID NO: 53 o una sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 408.

In un esempio facoltativo preferito della descrizione, i polinucleotidi della descrizione comprendono, o in alternativa consistono, in polinucleotidi che codificano frammenti Fab (fragment antigen binding)

aventi specificità di legame per NGF. Per quanto riguarda il frammento di anticorpo Fab2, i polinucleotidi che codificano il frammento Fab includono il polinucleotide SEQ ID NO: 409 che codifica la sequenza a catena leggera di SEQ ID NO: 407 e il polinucleotide SEQ ID NO: 410 che codifica la sequenza a catena pesante di SEQ ID NO: 408.

Un altro esempio della descrizione contempla questi polinucleotidi incorporati in un vettore di espressione per l'espressione in cellule di mammifero come CHO, NSO, HEK-293, o in sistemi fungini, insetti, piante o microbi come cellule di lievito come il lievito *Pichia*. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*. In un esempio della descrizione qui descritta (infra), i frammenti Fab possono essere prodotti attraverso l'espressione di polinucleotidi Fab2 in cellule di mammifero come CHO, NSO o cellule HEK 293, funghi, insetti, piante o sistemi microbici come cellule di lievito (per esempio lievito diploide come *Saccharomyces diploide*) e altri ceppi di lievito. Le specie di *Pichia* adatte includono, ma non sono limitate a, *Pichia pastoris*.

In un esempio, la descrizione è facoltativamente diretta a un polinucleotide isolato che comprende un polinucleotide che codifica una sequenza aminoacidica

di anticorpi anti-NGF V<sub>H</sub> selezionata da SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43, 53, 63, 73, 83, 93, 103, 113, 123, 133, 143, 153, 163, 173, 183, 193, o 402, o che codifica una sua variante in cui almeno un residuo quadro (residuo FR) è stato sostituito con un aminoacido presente nella posizione corrispondente in un polipeptide V<sub>H</sub> dell'anticorpo di coniglio anti-NGF o una sostituzione conservativa di aminoacidi.

In un altro esempio opzionale, la descrizione è diretta a un polinucleotide isolato che comprende la sequenza polinucleotidica che codifica una sequenza aminoacidica di anticorpi anti-NGF V<sub>L</sub> di 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 141, 151, 161, 171, 181, 191, o 401, o codificante una sua variante in cui almeno un residuo quadro (residuo FR) è stato sostituito con un amminoacido presente nella posizione corrispondente in un polipeptide V<sub>L</sub> dell'anticorpo anti-NGF di coniglio o una sostituzione conservativa di amminoacidi.

In un altro esempio opzionale, la descrizione è diretta a uno o più polinucleotidi eterologhi che comprendono una sequenza che codifica i polipeptidi contenuti in SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:13; SEQ ID NO:21 e SEQ ID NO:23; SEQ ID NO:31 e SEQ ID NO:33; SEQ ID NO:411 e SEQ ID NO:43;

SEQ ID NO:51 e SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:61 e SEQ ID NO:63; SEQ ID NO:71 e SEQ ID NO:73; SEQ ID NO:81 e SEQ ID NO:83; SEQ ID NO:91 e SEQ ID NO:93; SEQ ID NO:101 e SEQ ID NO:103; SEQ ID NO:111 e SEQ ID NO:113; SEQ ID NO:121 e SEQ ID NO:123; SEQ ID NO:131 e SEQ ID NO:133; SEQ ID NO:141 e SEQ ID NO:143; SEQ ID NO:151 e SEQ ID NO:153; SEQ ID NO:161 e SEQ ID NO:163; SEQ ID NO:171 e SEQ ID NO:173; SEQ ID NO:181 e SEQ ID NO:183; SEQ ID NO:191 e SEQ ID NO:193; o SEQ ID NO:401 e SEQ ID NO:403.

In un altro esempio, la descrizione è opzionalmente diretta a un polinucleotide isolato che esprime un polipeptide contenente almeno un polipeptide CDR derivato da un anticorpo anti-NGF dove detto polipeptide espresso da solo lega specificamente NGF o lega specificamente NGF quando espresso in associazione con un'altra sequenza polinucleotidica che esprime un polipeptide contenente almeno un polipeptide CDR derivato da un anticorpo anti-NGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore, dove detto almeno un CDR è selezionato tra quelli contenuti nei polipeptidi VL o VH del SEQANGF per il trattamento o la prevenzione del dolore e delle condizioni associate al dolore, dove detto almeno un CDR è selezionato tra quelli contenuti nei

polipeptidi VL o VH di SEQ ID NO: 1, 3, 11, 13, 21, 23, 31, 33, 41, 43, 51, 53, 61, 63, 71, 73, 81, 83, 91, 93, 101, 103, 111, 113, 121, 123, 131, 133, 141, 143, 151, 153, 161, 163, 171, 173, 181, 183, 191, 193, 401 o SEQ ID NO:403.

Sono contemplati anche cellule ospiti e vettori che comprendono detti polinucleotidi.

La descrizione contempla inoltre facoltativamente vettori che comprendono le sequenze polinucleotidiche che codificano le sequenze polipeptidiche variabili delle catene pesanti e leggere, nonché le singole regioni che determinano la complementarità (CDR, o regioni ipervariabili), come stabilito nel presente documento, nonché cellule ospiti che comprendono dette sequenze vettoriali. In un esempio della descrizione, la cellula ospite è una cellula di lievito. In un altro esempio della descrizione, la cellula ospite del lievito appartiene al genere *Pichia*.

#### **ESEMPI**

Gli esempi che seguono sono presentati in modo da fornire a quelli di ordinaria abilità nella tecnica una completa divulgazione e descrizione di come realizzare e utilizzare l'oggetto dell'invenzione, e non intendono limitare la portata di ciò che gli inventori considerano la loro invenzione. Si è cercato di

garantire l'accuratezza rispetto ai numeri utilizzati (ad esempio, quantità, temperatura, concentrazioni ecc.), ma occorre tener conto di alcuni errori e deviazioni sperimentali. Se non diversamente indicato, le parti sono parti in peso, il peso molecolare è il peso molecolare medio ponderale, la temperatura è in gradi centigradi e la pressione è o quasi atmosferica.

### **ESEMPIO 1**

Questo esempio descrive i metodi di coltura che hanno migliorato la purezza degli anticorpi ricombinanti prodotti da cellule *P. pastoris* in coltura. Quando un bolo di etanolo è stato aggiunto durante la coltura, gli anticorpi risultanti hanno mostrato una grande diminuzione della concentrazione di una variante associata al prodotto indesiderato.

#### *Metodi*

Per generare l'inoculo, il *P. pastoris* diploide è stato coltivato utilizzando un terreno composto dai seguenti nutrienti (le percentuali sono date come p/v): estratto di lievito 3%, destrosio anidro 2%, YNB 1,34%, biotina 0,004% e 100 mM fosfato di potassio (pH 6,0). Il mezzo di inoculo per le corse L355, L357, L358, L359 e L360 era composto dai seguenti nutrienti (le percentuali sono date come p/v): estratto

di lievito 3%, glicerolo 2%, YNB 1,34%, biotina 0,004%, fosfato di potassio 200 mM (pH 6,0) L'inoculo è stato coltivato per circa 24 ore a 29 ore in un incubatore ad agitazione a 30°C e 300 rpm. Un inoculo del 10% è stato poi aggiunto ai recipienti Labfors da 2,5 L di volume di lavoro contenenti 1 L di terreno di crescita sterile. Il terreno di crescita era composto dai seguenti nutrienti: solfato di potassio 18,2 g/L, fosfato di ammonio monobasico 36,4 g/L, fosfato di potassio dibasico 12,8 g/L, solfato di magnesio eptaidrato 3,72 g/L, citrato di sodio diidrato 10 g/L, glicerolo 40 g/L, estratto di lievito 30 g/L, metalli in traccia PTM1 4,35 mL/L, e antischiuma 204 1,67 mL/L. La soluzione di metalli in tracce PTM1 era composta dai seguenti componenti: solfato rameico pentaidrato 6 g/L, ioduro di sodio 0.08 g/L, solfato di manganese idrato 3 g/L, molibdato di sodio biidrato 0.2 g/L, acido borico 0.02 g/L, cloruro di cobalto 0.5 g/L, cloruro di zinco 20 g/L, solfato ferroso eptaidrato 65 g/L, biotina 0.2 g/L, e acido solforico 5 mL/L. Il ceppo di lievito è stato ingegnerizzato per esprimere l'anticorpo Ab-A da quattro copie genomiche integrate della sequenza codificante della catena pesante (SEQ ID NO: 441) e 3 copie della sequenza di codifica a catena leggera (SEQ ID NO: 440). Le copie

del gene della catena pesante sono state integrate nel locus pGAP (3 copie) e nel locus HIS4 TT (1 copia) mentre le 3 copie del gene della catena leggera sono state integrate nel locus pGAP. Le copie del gene della catena di anticorpi erano ciascuna sotto il controllo del promotore GAP. I parametri di controllo del processo del bioreattore sono stati impostati come segue: Agitazione 1000 rpm, flusso d'aria 1,35 litri standard al minuto, temperatura 28°C e pH controllato (a 6) con idrossido di ammonio. Non è stata fornita alcuna integrazione di ossigeno.

Dopo l'aggiunta dell'inoculo, le colture di fermentazione sono state coltivate per circa 12-16 ore (la "fase di crescita"). La fase di crescita è terminata quando il glicerolo iniziale nel mezzo è stato consumato, come è stato rilevato da un picco di ossigeno disciolto ("DO") (un improvviso aumento della concentrazione di ossigeno disciolto). Le colture sono state poi affamate per circa tre ore dopo il picco di ossigeno disciolto ("fase di inedia") per la corsa L306. Per le altre corse, il bolo di etanolo è stato aggiunto immediatamente dopo il picco DO. Un bolo di etanolo è stato poi aggiunto al reattore per dare una concentrazione finale dell'1% di etanolo (p/v). Le colture di controllo sono state trattate in modo

identico, tranne che l'aggiunta in bolo di etanolo è stata omessa. Le colture di fermentazione sono state lasciate equilibrare per 15-30 minuti ("fase di equilibrio"). Dopo la fase di equilibrio, il mangime è stato aggiunto ad un tasso costante di 30 g/L/hr per 40 minuti ("fase di transizione"). Per il resto della cultura ("fase di produzione") la concentrazione di etanolo è stata rilevata utilizzando una sonda di rilevamento dell'etanolo (Raven Biotech) che è stata utilizzata per controllare il tasso di alimentazione, con il tasso di alimentazione impostato a 15 g/L/ora quando la concentrazione di etanolo era inferiore al set point, o 7,5 g/L/ora quando la concentrazione di etanolo era superiore al set point. Nei casi in cui l'alto tasso di alimentazione di 15 g/L/ora non era abbastanza alto per mantenere l'etanolo al set è point (che si è verificato nella fermentazione L315), l'alto tasso di alimentazione è stato impostato a 22,5 g/L/ora mentre il basso tasso di alimentazione è stato impostato a 15 g/L/ora. Lo stesso set point è stato mantenuto indipendentemente dall'aggiunta di un bolo di etanolo alla coltura (la produzione di etanolo da parte del lievito ha causato il raggiungimento del set point senza l'aggiunta di etanolo in bolo). Il mangime era composto dai seguenti componenti:

estratto di lievito 50 g/L, destrosio anidro 500 g/L, solfato di magnesio eptaidrato 3 g/L, metalli in traccia PTM1 12 mL/L, e citrato di sodio diidrato 0.5g/L Il tempo totale di fermentazione era tipicamente da 85 ore a 97 ore in questi esperimenti, sebbene possano essere utilizzati anche tempi più lunghi o più brevi.

Dopo la fase di produzione, alle colture di fermentazione sono stati aggiunti PEI (polietileneimmina) e EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) rispettivamente allo 0,05% p/v e 3 mM di concentrazione finale. Le colture sono state poi filate in una centrifuga e gli anticorpi sono stati purificati dal surnatante della coltura per affinità alla proteina A. In breve, circa 20 mL di surnatanti chiarificati da 0.2 $\mu$  dal brodo di fermentazione raccolto sono stati diluiti con lo stesso volume di tampone di equilibrio (20 mM Histidine pH6). Da questo brodo diluito, 20 mL sono stati poi caricati su una colonna pre-equilibrata da 1 mL HiTrap MabSelect Sure (GE, Piscataway, NJ). La colonna è stata successivamente lavata usando 40 volumi di colonna del tampone di equilibrio. L'anticorpo legato alla colonna è stato eluito utilizzando un gradiente di passo in un tampone di eluizione al 100% (100 mM di acido citrico a pH 3.0). Le frazioni di un

mL sono state raccolte e immediatamente neutralizzate con 100 $\mu$ L di tampone Tris 2M pH 8.0. Le frazioni contenenti proteine sono state determinate misurando l'assorbanza a 280nm e le frazioni contenenti proteine sono state raggruppate.

Gli anticorpi purificati dalla proteina A sono stati analizzati per la purezza mediante SDS-PAGE. Per i campioni non ridotti, la SDS-PAGE è stata effettuata utilizzando gel di poliacrilammide prefabbricati (NuPAGE® Bis-Tris Gels) contenenti un gradiente di poliacrilammide del 4%-12%, utilizzando NuPAGE® MES SDS running buffer e NuPAGE® LDS Sample Buffer (tutti di Invitrogen, Carlsbad, Ca.) secondo le istruzioni del produttore. Le proteine sono state poi visualizzate mediante colorazione blu Coomassie. I campioni ridotti sono stati processati nello stesso modo, tranne che i campioni sono stati ridotti prima del caricamento utilizzando il NuPAGE® Sample Reducing Agent (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) secondo le istruzioni del produttore.

### *Risultati*

Per determinare l'effetto di un'aggiunta di bolo di etanolo durante la coltura sulla purezza dell'anticorpo, l'anticorpo Ab-A è stato prodotto da colture di lievito con o senza l'aggiunta di un bolo di eta-

nolo a una concentrazione finale dell'1% (10 g/L) alla fine della fase di crescita e prima della fase di produzione. La fase di produzione è proseguita per 97 ore (**FIG. 1**), 87 ore (**FIG. 2**), o 86 ore (**FIG. 3**). L'anticorpo prodotto da ciascuna cultura è stato poi raccolto dai mezzi di coltura, purificato dalla cromatografia di affinità della proteina A.

La SDS-PAGE è stata utilizzata per rilevare l'abbondanza relativa dell'anticorpo completo, del "metà anticorpo" o complesso H1L1 (contenente una catena pesante e una leggera) e del complesso H2L1 (contenente due catene pesanti e una leggera). L'abbondanza dei complessi H1L1 e H2L1 era notevolmente diminuita nelle colture prodotte con l'aggiunta in bolo di etanolo. Questo miglioramento è stato riprodotto in tre esperimenti mostrati in **FIG. 1A**, confrontare le bande 2 e 3 (con bolo) a 5 (senza bolo); **FIG. 2A**, confrontare la banda 2 (con bolo) con la 3 (senza bolo); **FIG. 3A**, confrontare le bande 2 e 4 (con bolo) con le bande 5-7 (senza bolo). In condizioni di riduzione, le specie H1L1, H2L1 e l'anticorpo completo sono state separate ciascuna in catene pesanti e leggere individuali, confermando l'identità della banda di 75 kDa come costituita da una catena leggera e una pesante unite da un legame disolfuro (**FIGG. 1B e 2B**;

l'ordine delle bande è lo stesso delle **FIGG.** 1A e 1B, rispettivamente).

La diminuzione dell'abbondanza della specie H1L1 è stata poi quantificata usando ImageJ per tracciare la densità delle bande del gel lungo la lunghezza dei gel non ridotti (**FIGG.** 1C-E e 2C-D, rispettivamente corrispondenti a **FIG.** 1A, bande 2, 3 e 5, e **FIG.** 2A, bande 2 e 3, e **FIG.** 3B, corrispondente alle bande 2 e 4-6 di **FIG.** 3A). L'area sotto il picco H1L1 è stata quantificata e i risultati sono tabulati in **FIGG.** 1F, 2E, e 3B. Sulla base di queste misure, l'aggiunta di un bolo di etanolo prima della produzione di anticorpi ha diminuito l'abbondanza relativa della banda 75 kDa di circa il 90% in **FIG.** 1A, di circa l'85% in **FIG.** 2A, e di circa l'87% in **FIG.** 3A. In sintesi, questi risultati dimostrano che la concentrazione della specie H1L1 è stata notevolmente diminuita dall'aggiunta in bolo di etanolo alla coltura, con conseguente diminuzione della produzione della specie H1L1 tra circa l'85% e il 90%.

## **ESEMPIO 2**

Questo esempio estende i risultati ottenuti nell'esempio 1 dimostrando che gli stessi metodi hanno prodotto un miglioramento simile nella purezza dell'an-

anticorpo quando usato durante la produzione di due anticorpi aggiuntivi.

#### *Metodi*

Gli anticorpi Ab-B e Ab-C sono stati prodotti in modo ricombinante utilizzando i metodi descritti nell'esempio 1. L'anticorpo Ab-C è stato espresso da un ceppo di lievito ingegnerizzato contenente quattro copie della sequenza codificante della catena pesante (SEQ ID NO: 439) e tre copie della sequenza di codifica a catena leggera (SEQ ID NO: 438). I campioni sono stati prelevati dai reattori e il supernatante della coltura contenente gli anticorpi è stato raccolto dopo un tempo totale di fermentazione di 67 ore (T67) o 87 ore (T87) per l'anticorpo Ab-B e per 86 ore (T86) per l'anticorpo Ab-C, purificato per affinità alla proteina A e analizzato mediante SDS-PAGE come descritto nell'esempio 1.

#### *Risultati*

Gli anticorpi Ab-B (FIG. 4) e Ab-C (FIG. 5) sono stati prodotti con o senza un'aggiunta in bolo di etanolo ad una concentrazione finale dell'1% alla fine della fase di crescita e prima della fase di produzione. Per gli anticorpi prodotti senza l'aggiunta in bolo di etanolo, la specie H1L1 o metà anticorpo e la specie H2L1 sono state osservate ciascuna come una

banda prominente (**FIG.** 4A, bande 6 e 7; **FIG.** 4C, bande 6 e 7; **FIG.** 5A, bande 5 e 6). L'intensità di queste bande era notevolmente diminuita per la cultura prodotta con un'aggiunta in bolo di etanolo (**FIG.** 4A, bande 2-3; **FIG.** 4C, bande 2-3; **FIG.** 5A, banda 3). In condizioni di riduzione, le bande H1L1 e H2L1 sono state separate in catene pesanti e leggere individuali, confermando l'identità di queste specie come catene pesanti e leggere di lunghezza completa (**FIGG.** 4B, 4D e 5B; l'ordine delle bande è lo stesso delle **FIGG.** 4A, 4D e 5A rispettivamente).

La diminuzione dell'abbondanza delle specie H1L1 è stata poi quantificata usando ImageJ per tracciare la densità delle bande del gel lungo la lunghezza dei gel non ridotti. **FIGG.** 4E e 4F tabulano l'area contenuta nei picchi H1L1 mostrati nelle **FIGG.** 4A (T67) e 4C (T87), rispettivamente, dimostrando che l'aggiunta del bolo di etanolo ha prodotto una riduzione del 73% circa dell'abbondanza relativa dei complessi H1L1 nel punto temporale precedente mostrato in **FIG.** 4A e circa il 34% di riduzione media dell'abbondanza relativa dei complessi H1L1 nel punto temporale successivo mostrato in **FIG.** 4C. Analogamente, **FIG.** 5C tabula l'area contenuta nei picchi H1L1 mostrati in **FIGG.** 5A, dimostrando circa un 61% di riduzione media nell'ab-

bondanza relativa dei complessi H1L1 dall'aggiunta in bolo di etanolo.

In sintesi, questi risultati dimostrano che la concentrazione delle specie H1L1 e H2L1 è diminuita tra il 61% e il 73% circa con l'aggiunta in bolo di etanolo alla coltura per due anticorpi aggiuntivi con specificità di legame per bersagli diversi.

### **ESEMPIO 3**

Questo esempio descrive inoltre il miglioramento della purezza degli anticorpi ricombinanti prodotti da cellule *P. pastoris* coltivate attraverso l'aggiunta di un bolo di etanolo durante la coltura. Oltre a diminuire notevolmente l'abbondanza delle specie H1L1 e H2L1, questo esempio dimostra anche una diminuzione della concentrazione di altre varianti associate al prodotto.

#### *Metodi*

Gli anticorpi ricombinanti Ab-A, Ab-B e Ab-C sono stati preparati e purificati da colture di *P. pastoris* come descritto negli esempi 1 e 2. Gli anticorpi sono stati prodotti con o senza un'aggiunta in bolo di etanolo ad una concentrazione finale dell'1% (p/v) alla fine della fase di crescita e prima della fase di produzione. Per analizzare la purezza delle preparazioni di anticorpi purificati dalla proteina A, è

stata utilizzata la cromatografia liquida ad alte prestazioni per esclusione di dimensione (SE-HPLC). In breve, è stato utilizzato un Agilent (Santa Clara, CA) serie 1200 HPLC con strumento di rilevamento UV. Per la separazione dei campioni è stata utilizzata una colonna TSKgel 3000SW<sub>XL</sub> 7,8x300 mm collegata con una TSKgel Guard SW<sub>XL</sub> 6x40 mm della Tosoh Bioscience (King of Prussia, PA). Una soluzione di fosfato di sodio 100 mM, cloruro di sodio 200 mM pH 6.5 è stata utilizzata come fase mobile con una velocità di flusso di 0,5 mL/min in modalità isocratica e l'assorbanza a UV 215nm è stata monitorata. Prima dell'iniezione dei campioni la colonna è stata equilibrata fino a raggiungere una linea di base stabile. I campioni sono stati diluiti a una concentrazione di 1 mg/mL utilizzando la fase mobile e un volume di 30 µL è stato iniettato. Per monitorare le prestazioni della colonna, sono stati utilizzati standard di filtrazione su gel BioRad (Hercules, CA).

#### *Risultati*

Le preparazioni di anticorpi Ab-A descritte nell'esempio 1 e ulteriori preparazioni prodotte con gli stessi metodi sono state espresse in lievito, purificate per affinità della proteina A e poi analizzate per la purezza usando la cromatografia di esclusione

delle dimensioni (SEC). Nelle condizioni utilizzate, la specie metà anticorpo (H1L1) co-eluisce con l'anticorpo completo, il che si pensa sia dovuto all'associazione non covalente tra le coppie di metà anticorpi. Tuttavia, questo metodo permette di valutare la purezza rispetto ad altre varianti associate al prodotto, come complessi con stechiometria aberrante, frammenti, forme glicosilate e aggregati.

I dati SE-HPLC sono mostrati per i campioni Ab-A prodotti senza (FIGG. 6A, 6C e 6E) o con (FIGG. 6B, 6D e 6F) un'aggiunta in bolo di etanolo. Una variante associata al prodotto che consiste in un aggregato di due anticorpi completi (contenenti quattro catene pesanti e quattro leggere) è stata rilevata (freccia), e la sua abbondanza è stata ridotta in media nei campioni preparati con l'aggiunta del bolo. FIG. 7 mostra la quantificazione della purezza di Ab-A determinando la percentuale della preparazione di anticorpi contenuta nel picco principale (contenente l'anticorpo completo). L'aggiunta in bolo di etanolo ha aumentato la percentuale media contenuta nel picco principale dall'80,3% fino al 90,6%.

Un'analisi simile è stata eseguita per le preparazioni di anticorpi Ab-B e Ab-C descritte nell'esempio 2, quantificate nelle FIG. 8 e 9, rispettivamente. La

purezza complessiva dell'anticorpo Ab-B è stata migliorata, con un aumento della frazione media nel picco principale dal 76% al 79% a T67 e dal 60% al 73% a T87. Per l'anticorpo Ab-C, c'era poca differenza rilevabile nella purezza dell'anticorpo valutata con questo metodo, apparentemente a causa dell'elevata purezza iniziale dell'anticorpo Ab-C anche senza l'aggiunta del bolo.

In sintesi, questi risultati dimostrano che un'aggiunta in bolo di etanolo alla coltura può diminuire la concentrazione di altre varianti associate al prodotto, oltre alle specie mezzo-anticorpo.

#### **ESEMPIO 4**

Questo esempio descrive l'ulteriore conferma dell'identità della variante associata al prodotto 75 kDa come una specie di metà anticorpo contenente solo una catena pesante dell'anticorpo e solo una catena leggera dell'anticorpo. Questa ipotesi era basata su diverse osservazioni. In primo luogo, la banda di 75 kDa era presente nei campioni purificati dalla proteina A (si veda Esempio 1) indicando che conteneva almeno la porzione di legame alla proteina A di una catena pesante di anticorpi. In secondo luogo, la banda di 75 kDa era prominente nei campioni non ridotti analizzati mediante SDS-PAGE (vedere, ad esem-

pio, **FIG. 1A**, bande 2-3), ma in condizioni di riduzione gli stessi campioni non contenevano alcuna banda di intensità comparabile (oltre alle catene leggere e pesanti attese), indicando che la banda 75 kDa non include componenti diversi dalle catene pesanti e leggere dell'anticorpo (o altre specie con la stessa mobilità elettroforetica). In terzo luogo, la scomparsa della banda 75 kDa dai campioni ridotti indica anche che i suoi costituenti sono legati da almeno un legame disolfuro. In quarto luogo, l'analisi SEC ha dimostrato la co-eluzione della specie 75 kDa con l'anticorpo completo, suggerendo fortemente che la specie 75 kDa può auto-associarsi non covalentemente per formare un anticorpo completo (o un altro complesso dello stesso raggio idrodinamico apparente). Infine, il peso molecolare apparente di circa 75 kDa (determinato in riferimento a standard di elettroforesi), preso insieme all'osservazione (da gel denaturanti) che questo complesso era costituito solo da catene di anticorpi di lunghezza completa, era coerente con complesso contenente solo una catena pesante e solo una catena leggera, ma non era coerente con altri complessi.

*Metodi*

La spettrometria di massa è stata utilizzata per rilevare l'abbondanza relativa delle catene pesanti prive di legami disolfuro tra le catene pesanti (normalmente presenti agli aminoacidi 220 e 223) in diversi campioni. Duecentocinquanta microgrammi di ogni campione sono stati aggiunti in una provetta Eppendorf. Una quantità appropriata (-450  $\mu$ L) di tampone denaturante (6 M Guanidine-HCl, 1 mM EDTA, 0.25 M Tris, pH 7.5) è stata aggiunta alla provetta per ottenere un volume finale di 500  $\mu$ L e una concentrazione del campione di 0,5 mg/mL. Dodici microlitri e mezzo di Iodoacetamide 2 M sono stati aggiunti in ogni campione per alchilare qualsiasi cisteina libera. I campioni sono stati vortexati e poi incubati a temperatura ambiente, al buio, per  $30 \pm 5$  minuti. I campioni sono stati poi desalinizzati utilizzando colonne NAP-5 pre-equilibrate con tampone di digestione (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5). Ogni soluzione campione è stata aggiunta a colonne separate (pre-equilibrate) e lasciata entrare nel letto della colonna. Un millilitro di tampone di digestione è stato aggiunto ad ogni colonna e l'eluente è stato raccolto in provette Eppendorf. I campioni sono stati divisi in aliquote uguali contenenti circa 50  $\mu$ g di materiale (cinque aliquote da 200  $\mu$ L). Le aliquote alchilate e dissala-

te sono state conservate a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fino all'utilizzo. Un'aliquota di ogni campione (alchilato e dissalato) è stata usata per ogni digestione. La soluzione di tripsina a  $0,5\text{ mg/mL}$  è stata aggiunta ad ogni aliquota di campione in un rapporto 1:25 p:p di tripsina:proteina ( $4\text{ }\mu\text{L}$ ). Tutti i tubi di tripsina sono stati incubati a  $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 4 ore. Dopo l'incubazione, la digestione enzimatica è stata spenta aggiungendo  $1\text{ }\mu\text{L}$  di acido trifluoroacetico in ogni provetta. I campioni sono stati poi divisi in due porzioni uguali, ridotti e non ridotti. Metà dei campioni sono stati ridotti in presenza di  $1\text{ M DTT}$  per 1 ora a  $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Il contenuto dei campioni ridotti e non ridotti è stato trasferito in fiale HPLC e inserito nell'autocampionatore per l'analisi.

I dati MS e MS/MS sono stati raccolti su uno spettrometro di massa Micromass Q-TOF Ultima utilizzando la ionizzazione elettrospray (ESI) in modalità ione positivo. I dati sono stati acquisiti da  $m/z$  200-1950 in modalità MS. Prima dell'analisi, lo spettrometro di massa è stato calibrato utilizzando un fit di 5° ordine sugli ioni frammento di  $[\text{Glu}^1]\text{-Fibrinopeptide}$  che copre un intervallo da  $m/z$  175 a 1285. I volumi delle iniezioni sono stati regolati per ottenere un carico sulla colonna di circa  $20\text{ pmoli}$  di proteine.

*Risultati*

Sulla base delle osservazioni discusse sopra, i richiedenti hanno ipotizzato che la banda di 75 kDa fosse una specie di "metà anticorpo" contenente una catena di anticorpi pesanti e una catena di anticorpi leggeri legate covalentemente l'una all'altra attraverso legami disolfuro, e che coppie di complessi di metà anticorpi potessero associarsi non covalentemente per formare un complesso con la stessa stechiometria di un anticorpo completo (due catene pesanti e due catene leggere) ma senza i legami disolfuro tra le due catene pesanti ("catene pesanti non legate"). Sulla base di ciò, è stato previsto che l'abbondanza relativa della banda 75 kDa sarebbe correlata alla proporzione relativa di catene pesanti non collegate, che è stata determinata utilizzando l'analisi della spettrometria di massa di campioni di anticorpi digeriti con tripsina.

I frammenti peptidici di interesse per questo studio erano il frammento di tripsina T17 della catena pesante (T17H) che è composto da aminoacidi 217-242, rispettivamente. Gli aminoacidi 220 e 223 sono responsabili del legame disolfuro tra le catene pesanti degli anticorpi. Tipicamente, l'analisi della cisteina libera può essere condotta determinando un rappor-

to tra i residui di cisteina alchilati e i residui non alchilati nei campioni ridotti dopo una digestione triptica. Tuttavia, le specie alchilate non erano presenti in nessuno dei due lotti di materiale. Si è ipotizzato che i due residui di cisteina del frammento peptidico di interesse, T17H, fossero legati tra loro, o che le cisteine fossero protette dalla struttura quaternaria dell'anticorpo. In entrambi i casi, i residui di cisteina non sarebbero accessibili per l'alchilazione. Invece, l'approccio analitico è stato quello di utilizzare il rapporto tra specie non ridotte e specie ridotte in entrambi i lotti per calcolare una differenza percentuale. È stato osservato che i campioni non ridotti avevano una diminuzione di 2 Da nel peso molecolare, indicativa del legame disolfuro. Questo comportamento è stato sfruttato per calcolare la percentuale di T17H libero. La massa teorica della specie T17H non ridotta è 2727,41 Da (legame disolfuro tra Cys220 & Cys223) e 2729,41 Da per il peptide ridotto.

I cromatogrammi degli ioni estratti dei campioni ridotti e non ridotti sono stati analizzati per gli stati di carica rappresentativi. Il rapporto dei conteggi tra i campioni non ridotti e ridotti calcola che la specie T17H libera sia del 2,3% nell'anticorpo

prodotto con un'aggiunta di bolo di etanolo e del 26,1% nel campione prodotto senza un'aggiunta in bolo di etanolo. Questi risultati sono presentanti in forma tabulare in Fig. 9.

Così, l'abbondanza di catene pesanti prive del legame disolfuro inter-catena pesante era notevolmente aumentata nel campione prodotto senza l'aggiunta in bolo di etanolo, confermando ulteriormente l'identità di questa specie come contenente una catena pesante e una catena leggera ma priva di un legame disolfuro inter-catena pesante. Inoltre, il rilevamento di una specie 2 Da più leggera della massa prevista ha indicato che la catena pesante nella specie H1L1 può contenere un legame disolfuro extra a se stessa che può interferire con la formazione del normale legame disolfuro inter-catena pesante.

#### **ESEMPIO 5**

Questo esempio dimostra una correlazione tra la vitalità delle cellule e la purezza dell'anticorpo. L'aggiunta di un bolo di etanolo ha generalmente migliorato la vitalità delle cellule e la purezza dell'anticorpo per Ab-A e l'anticorpo Ab-B. Inoltre, l'anticorpo Ab-C, che già mostrava un'elevata purezza anche senza l'aggiunta del bolo, mostrava anche una maggiore vitalità della coltura. Presi insieme, questi ri-

sultati suggeriscono che il miglioramento della purezza dell'anticorpo risultante da un'aggiunta in bolo di etanolo è almeno parzialmente attribuibile a una maggiore vitalità della cultura.

#### *Metodi*

La vitalità della cultura è stata determinata usando un cellometro (Nexcelom). I campioni di coltura sono stati diluiti con PBS in modo che la conta finale delle cellule fosse compresa tra  $1 \times 10^7$  e  $5 \times 10^7$  cellule/mL. Una metà del campione è stata poi trattata a condizioni di calore di  $75^\circ\text{C}$  per 10 minuti come controllo positivo per la colorazione con ioduro di propidio (PI). Il campione non trattato e il campione trattato sono stati poi mescolati con PI (20 uL di campione più 20 uL di PI). Il campione è stato poi messo in una cassetta per vetrini e la vitalità è stata determinata contando il numero di cellule non fluorescenti e dividendo poi per il numero totale di cellule. Le cellule che sono morte hanno assorbito lo ioduro di propidio e sono fluorescenti, quindi il campione di controllo positivo ucciso dal calore dovrebbe mostrare meno dell'1% di cellule vive.

#### *Risultati*

La vitalità delle cellule è stata determinata per le colture che producono anticorpi coltivate con o senza

un'aggiunta in bolo di etanolo come descritto negli esempi 1 e 2. Come descritto sopra, la purezza degli anticorpi Ab-A e Ab-B è stata notevolmente migliorata da un'aggiunta in bolo di etanolo alla coltura di lievito (si veda Esempi 1-2 e FIGG. 1-4). L'aggiunta di un bolo di etanolo ha migliorato la vitalità delle cellule anche per queste culture. Per l'anticorpo Ab-A, la vitalità è migliorata dal 91,9% al 97,2% in media (FIG. 11), mentre per l'anticorpo Ab-B la vitalità è migliorata in media dall'84,8% al 95,1% (FIG. 12). A causa della purezza già elevata dell'anticorpo Ab-C prodotto anche senza l'aggiunta in bolo di etanolo, i miglioramenti della purezza di questo anticorpo derivanti dall'aggiunta in bolo di etanolo sono stati più modesti (si veda Esempio 3 e FIG. 5). Coerentemente con l'osservazione che un'alta vitalità cellulare era correlata a una maggiore purezza dell'anticorpo, le colture di anticorpi Ab-C hanno mostrato un'alta vitalità cellulare (95,8% in media) in assenza di un'aggiunta in bolo di etanolo, che è stata poco modificata dall'aggiunta in bolo di etanolo (96,8%).

Presi insieme, questi risultati indicano che il miglioramento della purezza degli anticorpi derivante dall'aggiunta di un bolo di etanolo può essere in

parte causato da (o almeno correlato a) un miglioramento della vitalità cellulare.

### **ESEMPIO 6**

Questo esempio dimostra che un miglioramento simile nella purezza dell'anticorpo può essere ottenuto con varie concentrazioni di bolo di etanolo.

#### *Metodi*

L'anticorpo Ab-A è stato prodotto come nell'esempio 1, tranne che l'aggiunta in bolo di etanolo era di 5 g/L (0,5% p/v), 10 g/L (1% p/v), o 15 g/L (1,5% p/v). I campioni di anticorpi sono stati purificati dai mezzi di coltura a 63 e 86 ore e purificati per affinità della proteina A, poi la purezza è stata analizzata da SDS-PAGE non ridotta come nell'esempio 1.

#### *Risultati*

La purezza dell'anticorpo era ugualmente elevata indipendentemente dalla concentrazione del bolo aggiunto (tra lo 0,5% e l'1,5% p/v), in entrambi i punti temporali testati, 63 ore (FIG. 14A) e 86 ore (FIG, 14B). I livelli rilevati delle specie H1L1 e H2L1 erano similmente bassi in ogni cultura.

Questi risultati indicano che il miglioramento della purezza degli anticorpi può essere ottenuto variando la concentrazione del bolo di etanolo.

### **ESEMPIO 7**

Questo esempio dimostra che miglioramenti simili nella purezza degli anticorpi possono essere raggiunti variando la durata del "periodo di inedia" tra il picco di ossigeno disciolto e l'aggiunta del bolo di etanolo alle colture.

#### *Metodi*

L'anticorpo Ab-A è stato prodotto come nell'esempio 1, tranne che la durata del periodo di inedia, il tempo tra il picco di ossigeno disciolto (che indica l'esaurimento della fonte di carbonio nella cultura) e l'aggiunta in bolo di etanolo, era 0 ore o 3 ore. I campioni di anticorpi sono stati purificati dai mezzi di coltura e purificati per affinità della proteina A, poi la purezza è stata analizzata mediante SDS-PAGE non ridotta come nell'esempio 1.

#### *Risultati*

La purezza dell'anticorpo era ugualmente elevata indipendentemente dalla variazione del periodo di inedia tra 0 e 3 ore (FIG. 15A, confrontare le bande 5 (0 ore di inedia) e 6 (3 ore di inedia)). I livelli rilevati delle specie H1L1 e H2L1 erano similmente bassi in ogni cultura.

Questi risultati indicano che il miglioramento della purezza degli anticorpi può essere ottenuto variando la durata del periodo di inedia.

**ESEMPIO 8**

Questo esempio testa l'effetto sulla purezza dell'anticorpo variando la durata del "periodo di equilibrio" tra l'aggiunta del bolo di etanolo e l'inizio dell'aggiunta del mangime alle colture.

*Metodi*

L'anticorpo Ab-B è stato prodotto come nell'esempio 2, tranne che la durata del periodo di equilibratura, il tempo tra l'aggiunta del bolo di etanolo e l'inizio dell'alimentazione della cultura, era di 0, 30 o 60 minuti. Inoltre, il ceppo di lievito da cui è stato prodotto l'anticorpo Ab-B conteneva tre copie del gene della catena leggera invece di quattro. I campioni di anticorpi sono stati purificati dai mezzi di coltura e purificati per affinità della proteina A, poi la purezza è stata analizzata mediante SDS-PAGE non ridotta come nell'esempio 1. La vitalità è stata anche valutata usando i metodi descritti nell'esempio 5.

*Risultati*

La purezza dell'anticorpo è stata ugualmente elevata per un periodo di equilibrio di 0 o 30 minuti (FIG. 16A, bande 7 e 8 (tempo di equilibrio 0 minuti) e banda 3 (tempo di equilibrio 30 minuti)). Tuttavia, i livelli rilevati delle specie H1L1 e H2L1 sono stati

aumentati nella cultura con il periodo di equilibrio di 60 minuti (FIG. 16A, bande 5 e 6).

La vitalità è stata anche valutata per ogni cultura ai punti di tempo di 23 ore e 85 ore. Per il periodo di equilibrio di 60 minuti, la vitalità era tra il 75% e l'80% a 23 ore, mentre allo stesso punto temporale la vitalità era circa 88-90% per i periodi di equilibrio di 0 e 30 minuti (FIG. 16B). Successivamente, a 85 ore, la vitalità era migliorata ma rimaneva un po' ridotta per il periodo di equilibrio di 60 minuti rispetto ai periodi di equilibrio di 0 e 30 minuti (FIG. 16C).

Questi risultati indicano che il miglioramento della purezza degli anticorpi può essere raggiunto variando il periodo di equilibrio almeno tra 0 e 30 minuti, mentre una certa perdita di vitalità e purezza può verificarsi per un periodo di equilibrio di 60 minuti o più (anche se la purezza può ancora essere migliorata rispetto a una cultura di controllo senza un'aggiunta in bolo di etanolo).

La precedente descrizione di forme di realizzazione illustrate dell'invenzione non intende essere esaustiva o limitare l'invenzione alla forma precisa descritta. Gli insegnamenti dell'invenzione qui forniti

possono essere applicati ad altri scopi, diversi dagli esempi sopra descritti.

L'invenzione può essere praticata in modi diversi da quelli particolarmente descritti nella descrizione e negli esempi precedenti.

Questi e altri cambiamenti possono essere apportati all'invenzione alla luce della descrizione dettagliata di cui sopra. In generale, nelle seguenti rivendicazioni, i termini usati non dovrebbero essere interpretati per limitare l'invenzione alle forme di realizzazione specifiche rivelate nella specifica e nelle rivendicazioni. Di conseguenza, l'invenzione non è limitata dalla divulgazione, ma invece la portata dell'invenzione deve essere determinata interamente dalle seguenti rivendicazioni.

Alcuni insegnamenti relativi all'umanizzazione degli anticorpi monoclonali derivati dal coniglio e le modifiche di sequenza preferite per mantenere l'affinità di legame dell'antigene sono stati divulgati nell'applicazione internazionale n PCT/US2008/064421 corrispondente alla pubblicazione internazionale n WO/2008/144757, intitolata "Novel Rabbit Antibody Humanization Methods and Humanized Rabbit Antibodies", depositata il 21 maggio 2008.

Alcuni insegnamenti relativi alla produzione di anticorpi o frammenti di essi utilizzando il lievito competente per l'accoppiamento e i metodi corrispondenti sono stati divulgati in Domanda di brevetto degli Stati Uniti n. 11/429,053, depositata l'8 maggio 2006 (Pubblicazione della domanda di brevetto degli Stati Uniti n US2006/0270045).

---

\*La lista delle sequenze é riportata alla fine della presente traduzione\*

---

#### RIVENDICAZIONI

1. Un metodo per la produzione di un complesso multisubunità, comprendente:
  - (a) fornitura di una coltura che comprende cellule di *Pichia pastoris* con geni che prevedono l'espressione delle subunità di detto complesso multisubunità;
  - (b) aggiunta di un bolo di etanolo a detta coltura, che risulta in una concentrazione di etanolo in detta coltura tra 0,5% e 1,5% (p/v); e
  - (c) aggiunta di un mangime che comprende almeno una fonte di carbonio fermentabile a detta coltura, e

coltivando detta coltura per produrre detto complesso di multisubunità,  
in cui detto complesso multisubunità comprende un anticorpo intero o a lunghezza intera che comprende polipeptidi della catena pesante e leggera,  
in cui detto complesso multisubunità non è un anticorpo anti-NGF contenente le sequenze polipeptidiche SEQ ID NO: 401 e SEQ ID NO: 402.

2. Il metodo secondo la rivendicazione 1, dove:

(i) il bolo di etanolo aumenta la formazione di legami disolfuro stabili rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo;

(ii) il metodo di coltura diminuisce l'abbondanza relativa di una o più varianti associate al prodotto rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo;

(iii) il metodo di coltura diminuisce l'abbondanza relativa delle varianti associate al prodotto che hanno un peso molecolare apparente più alto o più basso di detto anticorpo desiderato come rilevato dalla cromatografia di esclusione delle dimensioni o dall'elettroforesi del gel rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo;

(iv) il metodo di coltura diminuisce l'abbondanza relativa di anticorpi con stechiometria aberrante ri-

spetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo;

(v) il metodo di coltura diminuisce l'abbondanza relativa di anticorpi con legami disolfuro aberranti rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo;

(vi) il metodo di coltura diminuisce l'abbondanza relativa di anticorpi con cisteine ridotte rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo;

(vii) il metodo di coltura diminuisce l'abbondanza relativa di anticorpi con glicosilazione aberrante rispetto allo stesso metodo effettuato in assenza del bolo di etanolo;

(viii) il metodo di coltura modula la formazione o la stabilità dei legami disolfuro a catena interpesante;

(ix) il metodo di coltura modula la formazione o la stabilità dei legami disolfuro che collegano le catene leggere e pesanti di detto anticorpo;

(x) il metodo di coltura diminuisce l'abbondanza relativa di una o più delle varianti del prodotto-associato H1L1, H2L1 e H4L4; o

(xi) il metodo di coltura aumenta la purezza di detto anticorpo rispetto al metodo effettuato in assenza di detto bolo di etanolo.

3. Il metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui:

(i) la fase (b) dà come risultato una concentrazione di etanolo in detta cultura tra 0,7% e 1,5%, o tra 0,8% e 1,25% (p/v);

(ii) la fase (b) dà come risultato una concentrazione di etanolo in detta cultura che è 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8% o 0,9% (p/v);

(iii) la fase (b) dà come risultato una concentrazione di etanolo in detta cultura che è 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, o 0,5% (p/v);

(iv) la fase (b) comprende l'aggiunta di etanolo a detta coltura, l'aggiunta di un vettore comprendente etanolo a detta coltura, l'aggiunta di dette cellule a un mezzo o vettore comprendente etanolo, o la sostituzione di parte del mezzo di coltura;

(v) il bolo di etanolo viene aggiunto al mezzo di coltura per un periodo di tempo compreso tra 1 e 20 minuti;

(vi) la fase (c) comprende la fornitura di ossigeno a dette cellule;

(vii) la fase (c) comprende la fornitura di ossigeno a dette cellule agitando la coltura;

(viii) la fase (c) comprende la fornitura di ossigeno a dette cellule contattando detta cultura con una miscela di gas contenente ossigeno;

(ix) il passo (c) comprende l'aggiunta di un mangime comprendente uno o più di glucosio, etanolo, citrato, sorbitolo, xilosio, trealosio, arabinosio, galattosio, fruttosio, melibiosio, lattosio, maltosio, ramnosio, ribosio, mannosio, mannitolo e raffiniosio;

(x) il metodo di coltura comprende inoltre il mantenimento della concentrazione di etanolo tra un set point superiore e un set point inferiore durante la fase (c);

(xi) il metodo di coltura comprende inoltre il mantenimento della concentrazione di etanolo tra un set point superiore e un set point inferiore durante la fase (c), dove detto set point inferiore è 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8% o 0,9% (p/v);

(xii) il metodo di coltura comprende inoltre il mantenimento della concentrazione di etanolo tra un set point superiore e un set point inferiore durante la fase (c), dove detto set point superiore è 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, o 0,6% (p/v); o

(xiii) il metodo di coltura comprende inoltre il mantenimento della concentrazione di etanolo tra un set

point superiore e un set point inferiore durante la fase (c), dove detto set point inferiore è 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8% o 0,9% (p/v) e detto set point superiore è 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, o 0,6% (p/v).

4. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui:

(i) la concentrazione di etanolo è mantenuta ad un set point durante la fase (c);

(ii) la concentrazione di etanolo è mantenuta ad un set point che è 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, o 1,5% (p/v) durante la fase (c);

(iii) la fase (c) comprende il mantenimento della concentrazione di etanolo in detta cultura tra lo 0,7% e l'1,5%, o tra lo 0,8% e l'1,25% (p/v);

(iv) la concentrazione di etanolo nella cultura della fase (c) è mantenuta controllando la produzione di etanolo da parte di dette cellule o aggiungendo etanolo a detta cultura;

(v) la concentrazione di etanolo nella coltura della fase (c) è mantenuta controllando la produzione di etanolo da parte di dette cellule o aggiungendo etanolo a detta coltura, dove la fase di controllo della produzione di etanolo comprende il controllo di una o

più concentrazioni di glucosio, disponibilità di ossigeno, intensità di agitazione, pressione del gas, portata dell'aria fornita o altra miscela di gas, viscosità della coltura, densità della coltura, concentrazione di ossigeno nell'aria fornita o altra miscela di gas e temperatura;

(vi) il tempo tra la fase (a) e la fase (b) è inferiore a 72 ore, inferiore a 48 ore, inferiore a 24 ore, inferiore a 12 ore, inferiore a 9 ore, inferiore a 6 ore, inferiore a 5 ore, inferiore a 4 ore, inferiore a 3 ore, inferiore a 90 minuti, inferiore a 30 minuti, inferiore a 5 minuti, o inferiore a 1 minuto;

(vii) il tempo tra il passo (b) e il passo (c) è inferiore a 10 ore, meno di 9 ore, meno di 8 ore, meno di 7 ore, meno di 6 ore, meno di 5 ore, meno di 4 ore, meno di 3 ore, meno di 2 ore, meno di 90 minuti, meno di 80 minuti, meno di 70 minuti, meno di 60 minuti, meno di 50 minuti, meno di 40 minuti, meno di 30 minuti, meno di 20 minuti, meno di 10 minuti, meno di 5 minuti, o meno di 1 minuto;

(viii) la coltura della fase (a) è prodotta aggiungendo una fonte di carbonio a detta coltura e coltivando detta coltura fino all'esaurimento della fonte di carbonio;

(ix) la coltura del passo (a) è prodotta aggiungendo una fonte di carbonio a detta coltura e coltivando detta coltura fino all'esaurimento della fonte di carbonio, dove detta fonte di carbonio comprende uno o più di: glicerolo, glucosio, etanolo, citrato, sorbitolo, xilosio, trealosio, arabinosio, galattosio, fruttosio, melibiosio, lattosio, maltosio, ramnosio, ribosio, mannosio, mannitolo e raffiniosio.

(x) la coltura della fase (a) è prodotta aggiungendo una fonte di carbonio a detta coltura e coltivando detta coltura fino all'esaurimento della fonte di carbonio, dove l'esaurimento della fonte di carbonio è determinato dal rilevamento di una diminuzione dell'attività metabolica delle cellule di *Pichia pastoris*;

(xi) la coltura della fase (a) è prodotta aggiungendo una fonte di carbonio a detta coltura e coltivando detta coltura fino all'esaurimento della fonte di carbonio, dove l'esaurimento della fonte di carbonio è determinato dal rilevamento di una diminuzione dell'attività metabolica di dette cellule di *Pichia pastoris*, dove detta diminuzione dell'attività metabolica di dette cellule di *Pichia pastoris* è identificata rilevando una diminuzione del consumo di ossigeno da parte di dette cellule di *Pichia pastoris*,

rilevando un aumento del pH nella cultura, rilevando una stabilizzazione della massa cellulare umida, o rilevando un aumento della concentrazione di ammoniacca nella cultura; o

(xii) la coltura della fase (a) è prodotta aggiungendo una fonte di carbonio a detta coltura e coltivando detta coltura fino all'esaurimento della fonte di carbonio, dove l'esaurimento della fonte di carbonio è determinato dal rilevamento di una diminuzione dell'attività metabolica di dette cellule di *Pichia pastoris*, dove detta diminuzione dell'attività metabolica di dette cellule di *Pichia pastoris* è identificata dal rilevamento di una diminuzione del consumo di ossigeno da parte di dette cellule di *Pichia pastoris*, rilevando un aumento del pH nella coltura, rilevando la stabilizzazione della massa cellulare umida, o rilevando un aumento della concentrazione di ammoniacca nella coltura, dove detta diminuzione nel consumo di ossigeno da parte di dette cellule di *Pichia pastoris* è identificata rilevando un aumento della concentrazione di ossigeno disciolto in detta coltura.

5. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui:

(i) le cellule di *Pichia pastoris* comprendono geni integrati nel loro genoma che forniscono l'espressione di detto anticorpo, dove tali geni sono integrati in uno o più loci genomici;

(ii) le cellule di *Pichia pastoris* comprendono geni integrati nel loro genoma in loci selezionati dal gruppo costituito dal locus pGAP, 3' locus AOX TT; PpURA5; OCH1; AOX1; HIS4; GAP; pGAP; 3' AOX TT; ARG; e il locus HIS4 TT;

(iii) i geni che codificano le subunità dell'anticorpo sono espressi sotto il controllo di un promotore inducibile o costitutivo;

(iv) i geni che codificano le subunità dell'anticorpo sono espressi sotto il controllo di un promotore inducibile selezionato dal gruppo costituito dai promotori AOX1, CUP1, tetraciclina inducibile, tiamina inducibile e FLD1;

(v) almeno uno dei geni che codificano dette subunità dell'anticorpo è espresso sotto il controllo di un promotore selezionato dal gruppo composto da: promotori CUP1, AOX1, ICL1, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAP), FLD1, ADH1, alcol deidrogenasi II, GAL4, PHO3, PHO5 e Pyk, promotori inducibili con tetraciclina, promotori inducibili con tiamina, promotori chimerici da essi derivati, promotori di lieviti

to, promotori di mammiferi, promotori di insetti, promotori di piante, promotori di rettili, promotori di anfibi, promotori virali e promotori aviari; e/o

(xi) le cellule di *Pichia pastoris* sono cellule diploidi, tetraploidi o poliploidi.

6. Il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, comprendente inoltre almeno uno dei seguenti:

(i) purificare detto anticorpo da dette cellule di *Pichia pastoris* o dal mezzo di coltura;

(ii) purificare detto anticorpo da un componente intracellulare, citoplasma, nucleoplasma o una membrana di dette cellule *Pichia pastoris*;

(iii) le cellule di *Pichia pastoris* secernono detto anticorpo nel mezzo di coltura;

(iv) purificare detto anticorpo da detto mezzo di coltura;

(v) l'anticorpo comprende un anticorpo monospecifico o bispecifico;

(vi) l'anticorpo comprende un anticorpo umano o un anticorpo umanizzato;

(vii) l'anticorpo comprende un anticorpo umanizzato dove detto anticorpo umanizzato è di origine di topo, ratto, coniglio, capra, pecora o mucca;

- (viii) l'anticorpo comprende un anticorpo umanizzato di origine di coniglio;
- (ix) l'anticorpo comprende un anticorpo monovalente, bivalente o multivalente;
- (x) l'anticorpo è purificato da detta coltura per affinità della proteina A e/o della proteina G;
- (xi) almeno uno dei geni che forniscono l'espressione di una subunità di detto anticorpo in almeno una di dette cellule *Pichia pastoris* in detto pannello è ottimizzato per l'espressione in detta cellula di lievito;
- (xii) la purezza di detto anticorpo è valutata misurando la frazione dell'anticorpo prodotto da detta cellula di lievito che è contenuto in complessi di anticorpi aventi il raggio idrodinamico apparente previsto, è contenuto in complessi di anticorpi aventi il peso molecolare previsto, e/o lega specificamente un bersaglio di detto anticorpo;
- (xiii) la resa di detto anticorpo è valutata determinando la quantità di anticorpo prodotto da detta cellula di lievito scontando qualsiasi variante associata al prodotto che è anormalmente glicosilata, contenuta in complessi di anticorpi diversi dai complessi che hanno il raggio idrodinamico apparente previsto, contenuta in complessi di anticorpi che hanno il peso

molecolare previsto, e/o che non riescono a legarsi specificamente al bersaglio di detto anticorpo e il peso molecolare di detti complessi di anticorpi è facoltativamente determinato da SDS-PAGE non riducente;

(xiv) detto metodo comprende inoltre la purificazione di detto anticorpo;

(xv) le cellule di coltura producono un titolo anticorpale surnatante di almeno 100 mg/L, almeno 150 mg/L, almeno 200 mg/L, almeno 250 mg/L, almeno 300 mg/L, tra 100 e 300 mg/L, tra 100 e 500 mg/L, tra 100 e 1000 mg/L, almeno 1000 mg/L, almeno 1250 mg/litro, almeno 1500 mg/litro, almeno 1750 mg/litro, almeno 2000 mg/litro, almeno 10000 mg/litro, o più;

(xvi) una o più subunità di detto anticorpo sono espresse da più di una copia del gene;

(xvii) l'anticorpo è espresso da 1-10 copie di un gene che codifica la catena leggera di detto anticorpo e da 1-10 copie di un gene che codifica la catena pesante di detto anticorpo, opzionalmente integrato nel genoma di dette cellule;

(xviii) i geni che forniscono l'espressione di detto anticorpo sono contenuti in un elemento extracromosomico, plasmide o cromosoma artificiale;

(xix) le cellule di *Pichia pastoris* comprendono più copie del gene che prevede l'espressione della catena

leggera di detto anticorpo rispetto alle copie del gene che prevede l'espressione della catena pesante di detto anticorpo;

(xx) le cellule coltivate comprendono più copie del gene che fornisce l'espressione della catena leggera di detto anticorpo che copie del gene che fornisce l'espressione della catena pesante di detto anticorpo, dove il rispettivo numero di copie del gene che codifica la catena pesante di detto anticorpo e il numero di copie del gene che codifica la catena leggera di detto anticorpo in dette cellule sono: 2 e 2, 2 e 3, 3 e 3, 3 e 4, 3 e 5, 4 e 3, 4 e 4, 4 e 5, 4 e 6, 5 e 4, 5 e 5, 5 e 6 o 5 e 7; e

(xxi) le cellule coltivate comprendono più copie del gene che fornisce l'espressione della catena leggera di detto anticorpo che copie del gene che fornisce l'espressione della catena pesante di detto anticorpo, e inoltre dove il rispettivo numero di copie del gene che codifica la catena pesante di detto anticorpo e il numero di copie del gene che codifica la catena leggera di detto anticorpo in dette cellule sono: 2 e 1, 3 e 1, 4 e 1, 5 e 1, 6 e 1, 7 e 1, 8 e 1, 9 e 1, 10 e 1, 1 e 2, 2 e 2, 3 e 2, 4 e 2, 5 e 2, 6 e 2, 7 e 2, 8 e 2, 9 e 2, 10 e 2, 1 e 3, 2 e 3, 3 e 3, 4 e 3, 5 e 3, 6 e 3, 7 e 3, 8 e 3, 9 e 3, 10 e 3, 1 e

4, 2 e 4, 3 e 4, 4 e 4, 5 e 4, 6 e 4, 7 e 4, 8 e 4, 9 e 4, 10 e 4, 1 e 5, 2 e 5, 3 e 5, 4 e 5, 5 e 5, 6 e 5, 7 e 5, 8 e 5, 9 e 5, 10 e 5, 1 e 6, 2 e 6, 3 e 6, 4 e 6, 5 e 6, 6 e 6, 7 e 6, 8 e 6, 9 e 6, 10 e 6, 1 e 7, 2 e 7, 3 e 7, 4 e 7, 5 e 7, 6 e 7, 7 e 7, 8 e 7, 9 e 7, 10 e 7, 1 e 8, 2 e 8, 3 e 8, 4 e 8, 5 e 8, 6 e 8, 7 e 8, 8 e 8, 9 e 8, 10 e 8, 1 e 9, 2 e 9, 3 e 9, 4 e 9, 5 e 9, 6 e 9, 7 e 9, 8 e 9, 9 e 9, 10 e 9, 1 e 10, 2 e 10, 3 e 10, 4 e 10, 5 e 10, 6 e 10, 7 e 10, 8 e 10, 9 e 10, 10 e 10.

7. Il metodo secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui:

(i) la coltura della fase (c) è coltivata in un terreno di produzione;

(ii) la coltura del passo (c) è coltivata in un mezzo di produzione che comprende un mezzo minimo;

(iii) la coltura del passo (c) è coltivata in un mezzo di produzione comprendente un mezzo minimo privo di agenti selettivi;

(iv) la coltura del passo (c) è coltivata in un mezzo di produzione che comprende un mezzo minimo privo di aminoacidi preformati o altre biomolecole complesse;

(v) la coltura della fase (c) è coltivata in un mezzo di produzione che comprende un mezzo complesso;

(vi) la coltura del passo (c) è coltivata in un mezzo di produzione che comprende un mezzo complesso che comprende uno o più estratti di lievito, peptoni di soia e altri peptoni vegetali;

(vii) la coltura della fase (c) è coltivata fino a un'alta densità cellulare;

(viii) la coltura della fase (c) è coltivata fino a una densità cellulare di almeno 50 g/L;

(ix) la coltura della fase (c) è coltivata fino a una densità cellulare di almeno 100 g/L;

(x) la coltura della fase (c) è coltivata fino a una densità cellulare di almeno 300 g/L;

(xi) la coltura della fase (c) è coltivata fino a una densità cellulare di almeno 400 g/L;

(xii) la coltura della fase (c) è coltivata fino a una densità cellulare di almeno 500 g/L;

(xiii) la coltura della fase (c) è coltivata fino a una densità cellulare di almeno 750 g/L;

(xiv) le cellule di *Pichia pastoris* del passo (c) sono coltivate per almeno 20 raddoppiamenti e mantengono alti livelli di espressione di detto anticorpo dopo aver detto almeno 20 raddoppiamenti;

(xv) le cellule di *Pichia pastoris* della fase (c) sono coltivate per almeno 50 raddoppiamenti e mantengono

no alti livelli di espressione di detto anticorpo dopo detti almeno 50 raddoppiamenti; o

(xvi) le cellule di *Pichia pastoris* del passo (c) sono coltivate per almeno 100 raddoppiamenti e mantengono alti livelli di espressione di detto anticorpo dopo aver detto almeno 100 raddoppiamenti.

8. Il metodo di una delle rivendicazioni 1-7 in cui almeno una subunità dell'anticorpo è codificata da un gene che comprende un segnale di secrezione in cui facoltativamente il segnale di secrezione comprende uno o più polipeptidi selezionati dal gruppo costituito da: SEQ ID NOs: 414 e 437, e una loro combinazione.

9. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8 in cui il complesso multisubunità non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:5-10, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 15-20, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:25-30, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:35-40, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:45-50, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:55-60, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:65-70, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:75-80, non contiene tutte e sei le se-

quenze CDR di SEQ ID NOs:85-90, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:95-100, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 105-110, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NO: 115-120, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NO: 125-130, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:135-140, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 145-150, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NO: 155-160, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:165-170, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:175-180, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:185-190, non contiene tutte e sei le sequenze CDR di SEQ ID NOs:195-200.

10. Il metodo secondo le rivendicazioni da 1 a 9, in cui il complesso multisubunità non è un anticorpo anti-NGF.

11. Il metodo di una delle rivendicazioni da 1 a 8 o 10 in cui il complesso multisubunità non contiene almeno uno, almeno due, almeno tre, almeno quattro o almeno cinque dei CDR contenuti in uno dei seguenti anticorpi: un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NO 5-10, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NO 15-20, un anticorpo avente le sequenze CDR

di SEQ ID NO: 25-30, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 35-40, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 45-50, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 55-60, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 65-70, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 75-80, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 85-90, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 95-100, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 105-110, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 115-120, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 125-130, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 135-140, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 145-150, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 155-160, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 165-170, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 175-180, un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NOs: 185-190, o un anticorpo avente le sequenze CDR di SEQ ID NO: 195-200 e opzionalmente con specificità di legame per NGF.

---

Per traduzione conforme al testo originale

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Didascalia della lista delle sequenze:

<120> PRODUZIONE AD ALTA PUREZZA DI PROTEINE  
MULTISUBUNITÀ COME GLI ANTICORPI IN MICROBI  
TRASFORMATI COME LA PICHIA PASTORIS

<170> BrevettoIn versione 3.5

<213> Sintetico

<213> Homo sapiens

<213> Artificiale

<223> Peptide secrezione

<223> Anticorpo umanizzato

<213> Sequenza artificiale

Didascalia delle figure:

FIGURA 1A

Gel non ridotto

Ab (H2L2) completo

No bolo

Bolo di EtOH

FIGURA 1B

Gel ridotto

Pesante

Leggera

No bolo

Bolo di EtOH

FIGURA 1C

No bolo

Banda H1L1

FIGURA 1D

No bolo

Banda H1L1

FIGURA 1E

Bolo

Banda H1L1

FIGURA 1F

Abbondanza H1L1

Corsa

Bolo

Nessuno

Banda H1L1

FIGURA 2A

Gel non ridotto

Ab (H2L2) completo

No bolo

Bolo di EtOH

FIGURA 2B

Gel ridotto

Pesante

Leggera

No bolo

Bolo di EtOH

Figura 2C

No bolo

Banda H1L1

FIGURA 2D

Bolo

Banda H1L1

FIGURA 2E

Abbondanza H1L1

Corsa

Bolo

Nessuno

Banda H1L1

FIGURA 3A

Gel non ridotto

Bolo EtOH

No bolo

Ab (H2L2) completo

FIGURA 3B

Abbondanza H1L1

Corsa

Punto nel tempo

Bolo di Etanolo

Banda H1L1

Nessuno

FIGURA 4A

Gel non ridotto

Ab completo

No bolo

Bolo 10 g/L

FIGURA 4B

Gel ridotto

No bolo

Bolo 10 g/L

FIGURA 4C

Gel non ridotto

Completo

No bolo

Bolo 10 g/L

FIGURA 4D

Gel ridotto

No bolo

Bolo 10 g/L

FIGURA 4E

Abbondanza H1L1

Corsa

Punto nel tempo

Bolo di etanolo

Banda H1L1

Nessuno

FIGURA 4F

Abbondanza H1L1

Corsa

Punto nel tempo

Bolo di etanolo

Banda H1L1

Nessuno

FIGURA 5A

Gel non ridotto

Ab completo

Con Bolo

No bolo

FIGURA 5B

Gel ridotto

Con bolo

No Bolo

FIGURA 5C

Abbondanza H1L1

Corsa

Punto nel tempo

Bolo di etanolo

Banda H1L1

Nessuno

FIGURA 6A

Minuti

No bolo

FIGURA 6B

Minuti

Con bolo

FIGURA 6 CONTINUA

No bolo

Con bolo

FIGURA 6E

Minuti

No bolo

FIGURA 6F

Minuti

Con bolo

FIGURA 7

Numero corso

Serie di corsa

Bolo di etanolo

Tempo di fermentazione trascorso campionato

%picco principale SEC (anticorpo desiderato)

Nessuno

FIGURA 8

Numero corso

Bolo di etanolo

Tempo di fermentazione trascorso campionato

%picco principale SEC (anticorpo desiderato)

Nessuno

FIGURA 9

Numero corso

Bolo di etanolo

Tempo di fermentazione trascorso campionato

%picco principale SEC (anticorpo desiderato)

Nessuno

FIGURA 10

Banda H1L1 osservata

Percentuale relativa metà anticorpo (peptide T17H)

FIGURA 11

Vitalità

No bolo

Con Bolo EtOH

FIGURA 12

Vitalità

No bolo

Con Bolo EtOH

FIGURA 13

Vitalità

No bolo

Con Bolo EtOH

FIGURA 14A

Gel non ridotto

Ab completo

Bolo di Etanolo (g/L)

FIGURA 14B

Gel non ridotto

Bolo di Etanolo (g/L)

Ab completo

FIGURA 15A

Gel non ridotto

Ab completo

Periodo di inedia (ore)

FIGURA 15B

Gel ridotto

Periodo di inedia (ore)

FIGURA 16A

Periodo di equilibrio

Gel non ridotto

Ab completo

FIGURA 16B

Vitalità

Vitalità nelle 23 ore

Periodo di equilibrio

FIGURA 16C

Vitalità

Vitalità nelle 85 ore

Periodo di equilibrio

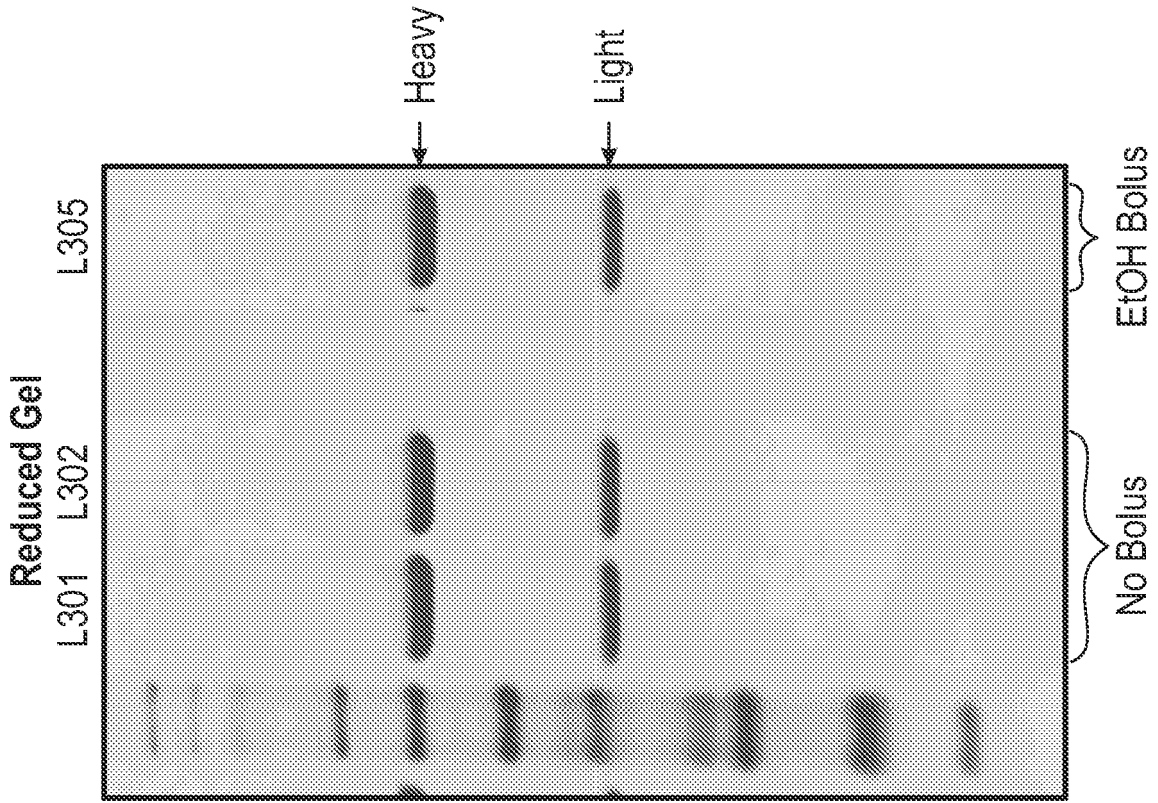


FIG. 1B

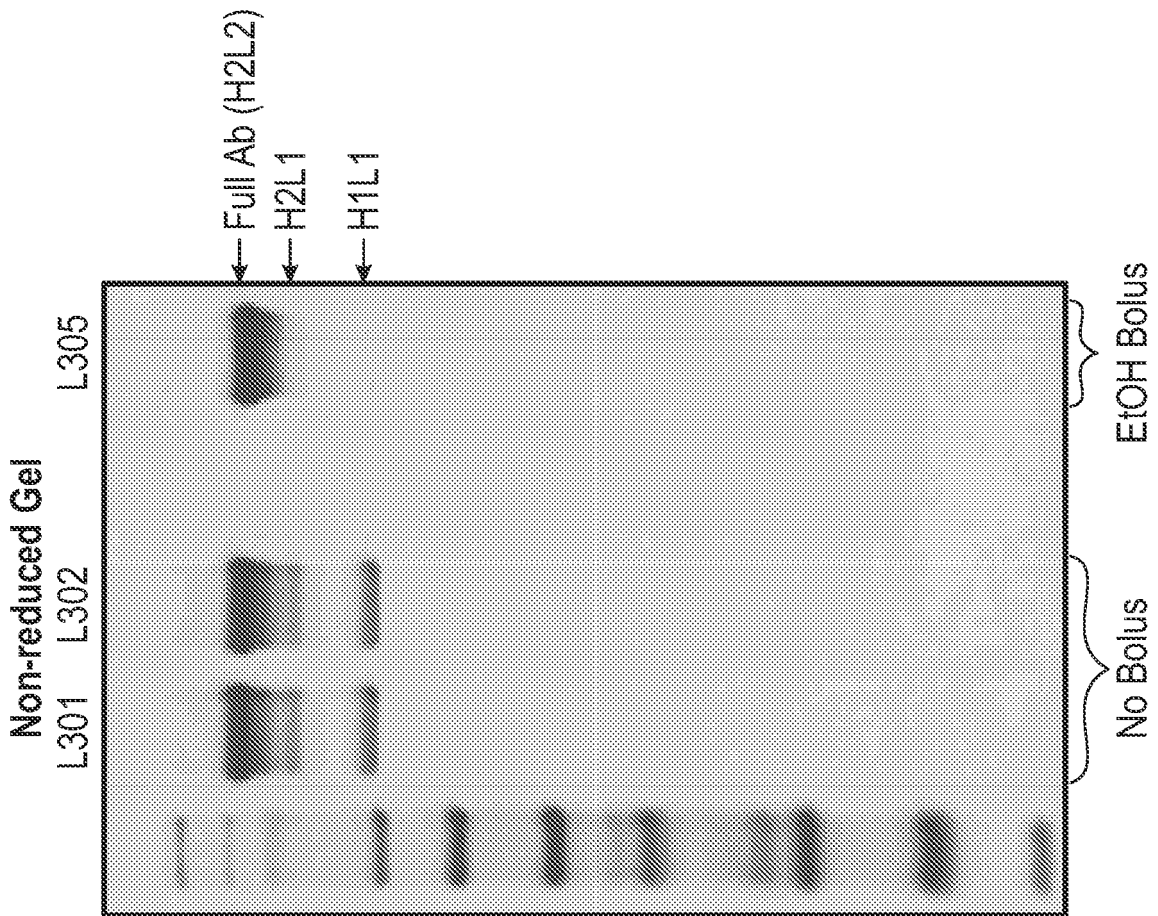


FIG. 1A

L301 No Bolus

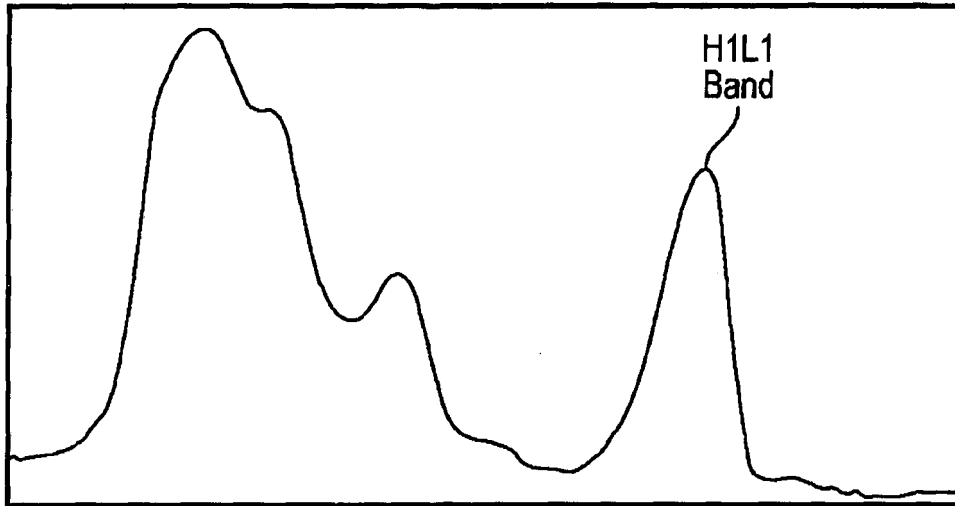


FIG. 1C

L302 No Bolus

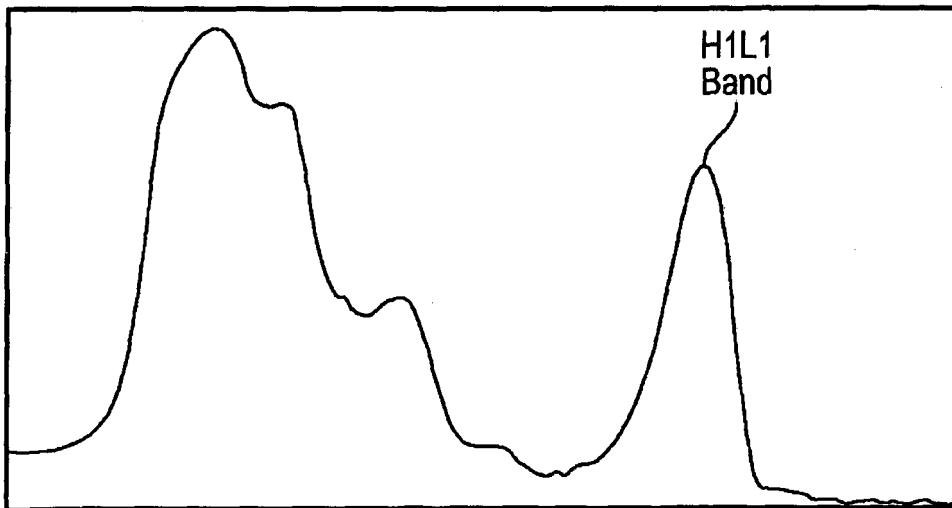
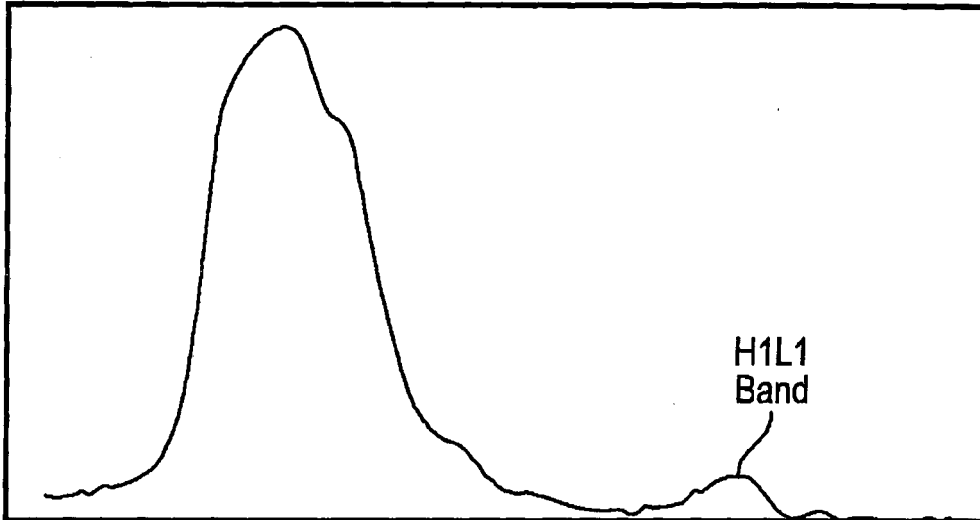


FIG. 1D

**L305 10 g/L Bolus**



**FIG. 1E**

**H1L1 Abundance**

<b>Run</b>	<b>Bolus</b>	<b>H1L1 Band</b>
L301	None	8034
L302	None	7993
L305	10 g/L	798

**FIG. 1F**

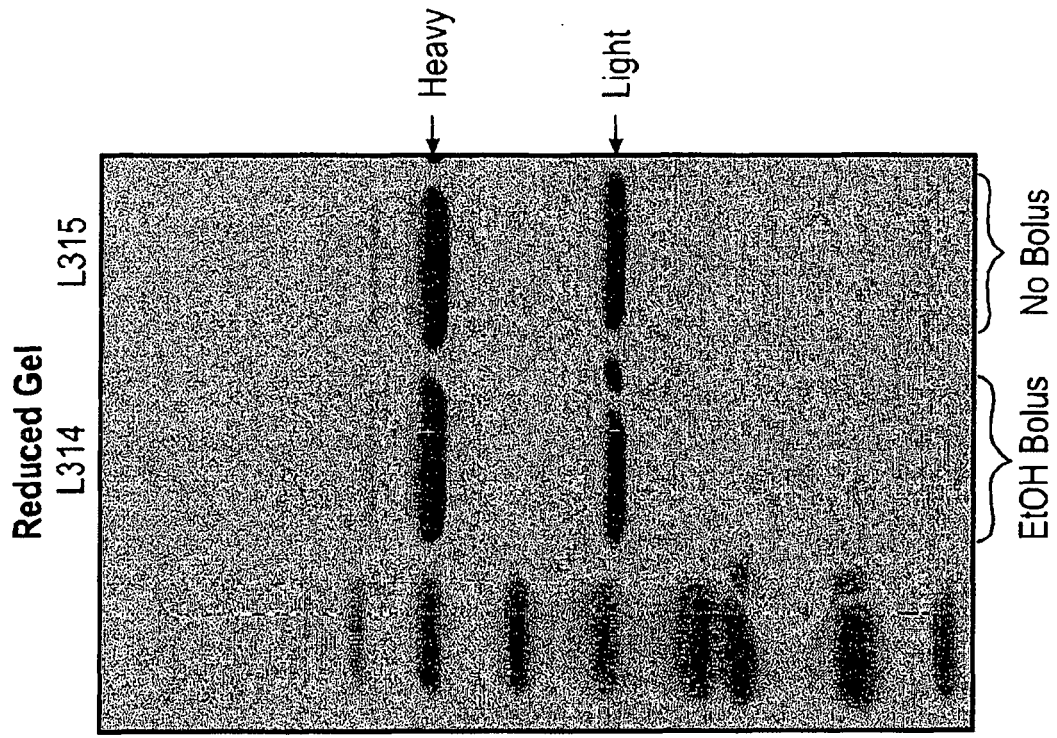


FIG. 2B

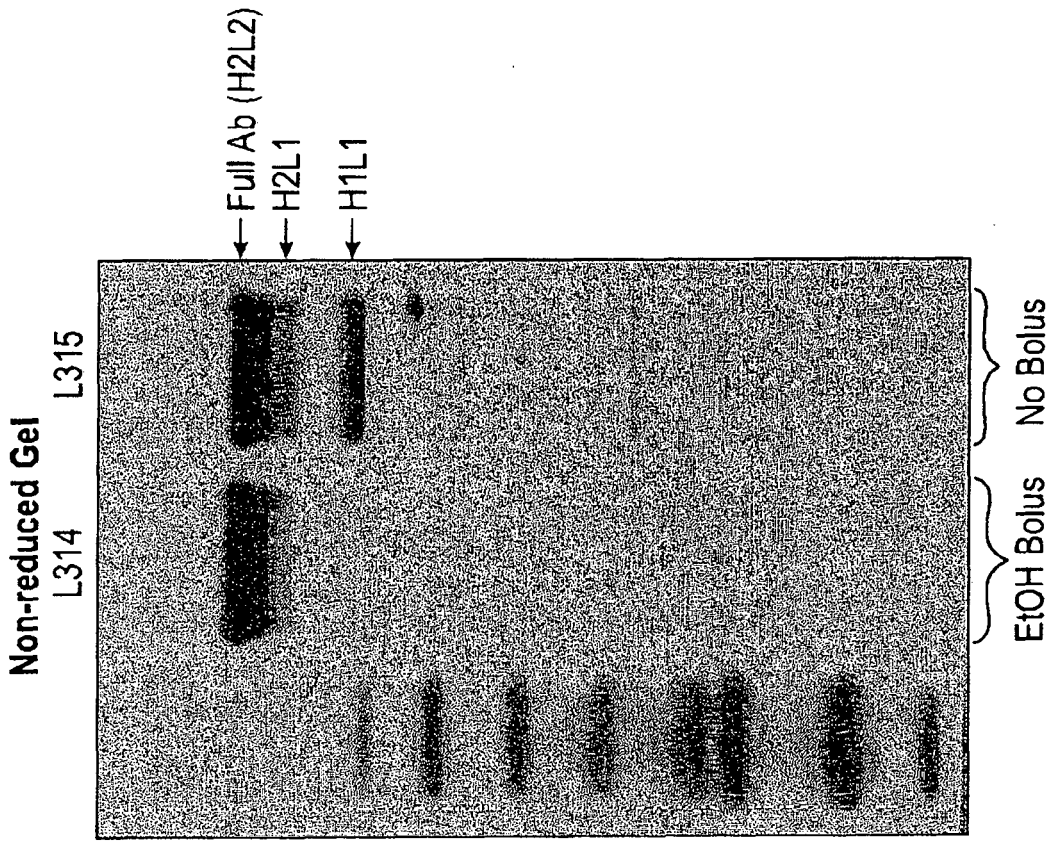
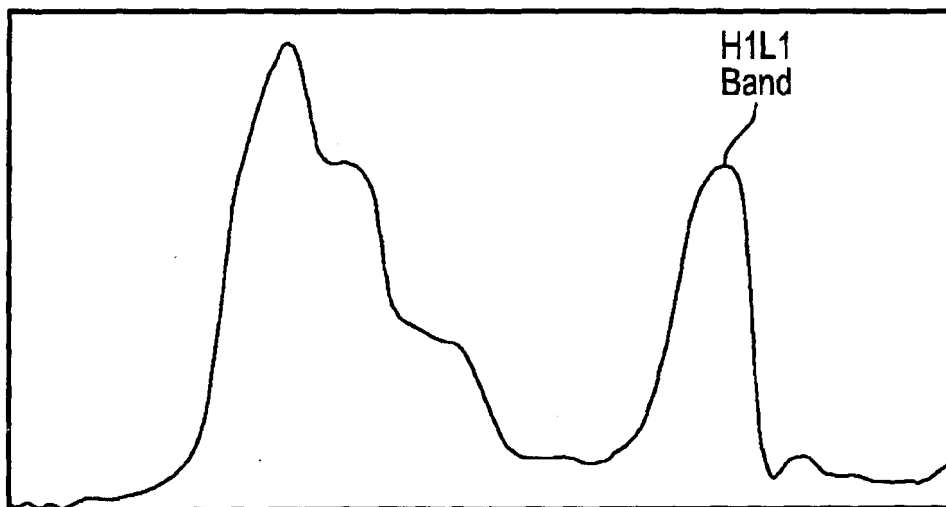


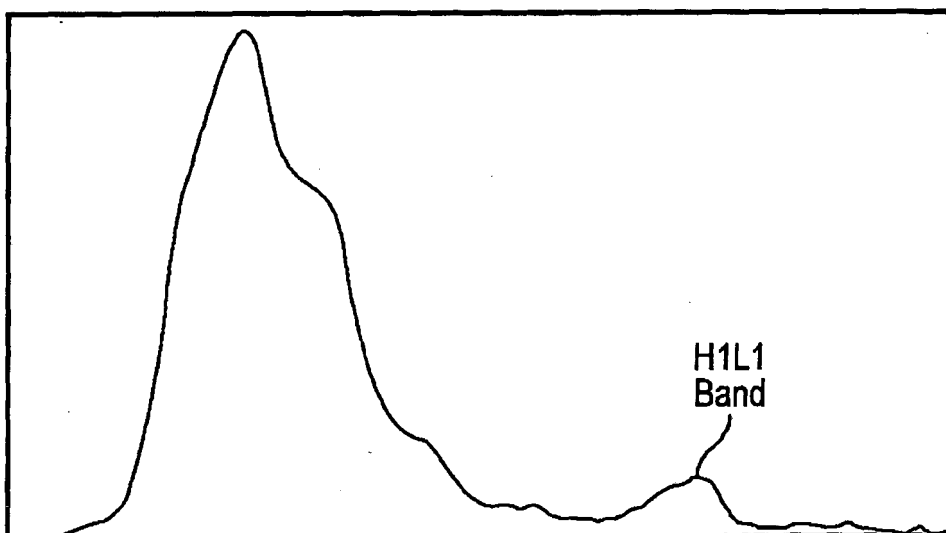
FIG. 2A

**L315 No Bolus**



**FIG. 2C**

**L314 10 g/L Bolus**

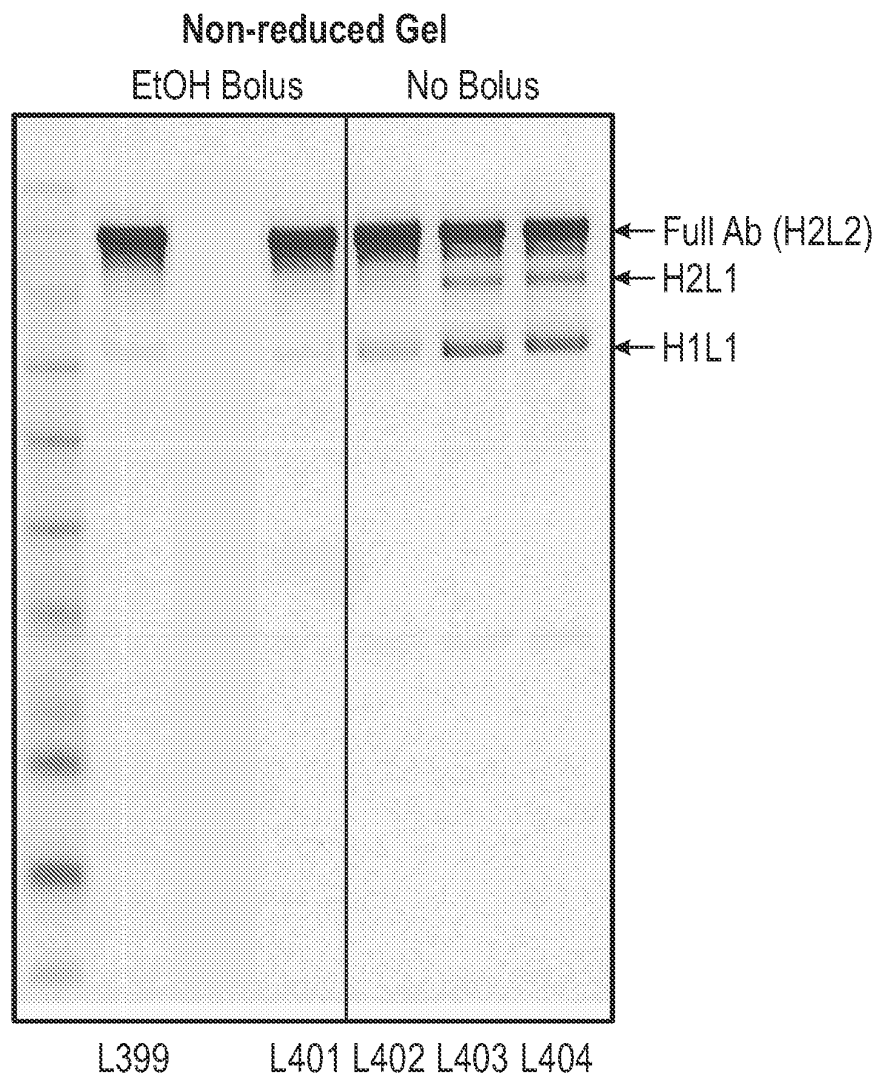


**FIG. 2D**

**H1L1 Abundance**

Run	Bolus	H1L1 Band
L314	10 g/L	9417
L315	None	1371

**FIG. 2E**



**FIG. 3A**

**H1L1 Abundance**

Run	Time Point	Ethanol Bolus	H1L1 Band
L399	T86	10 g/L	917
L401	T86	10 g/L	647
L402	T86	None	3089
L403	T86	None	7597
L404	T86	None	7574

**FIG. 3B**

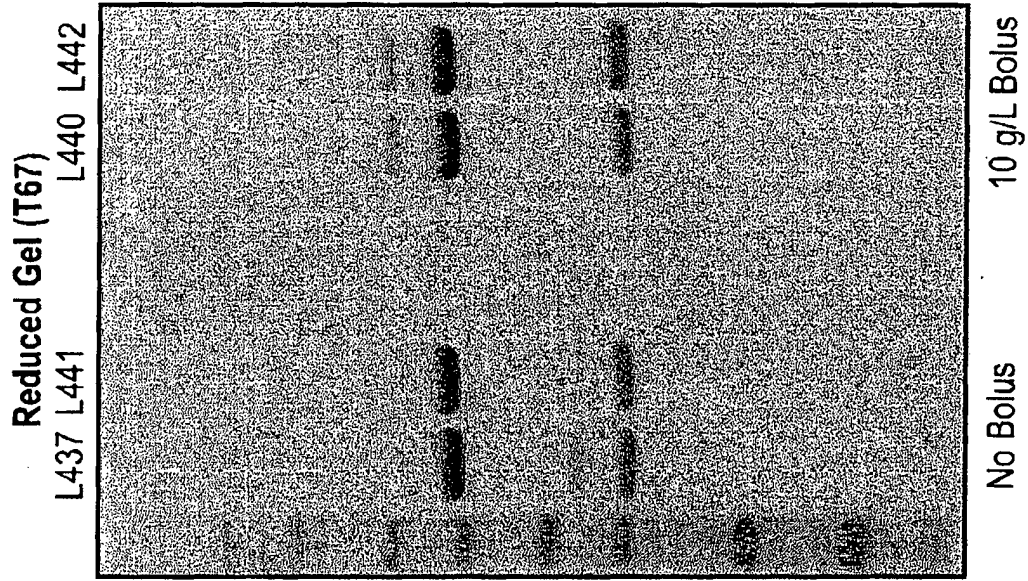


FIG. 4B

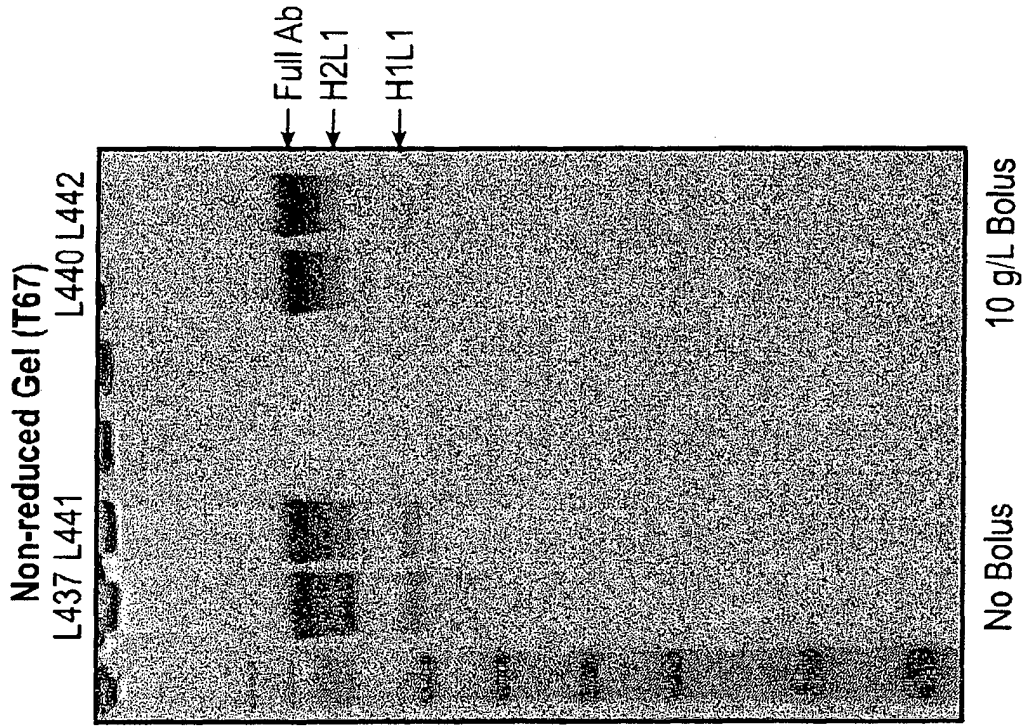
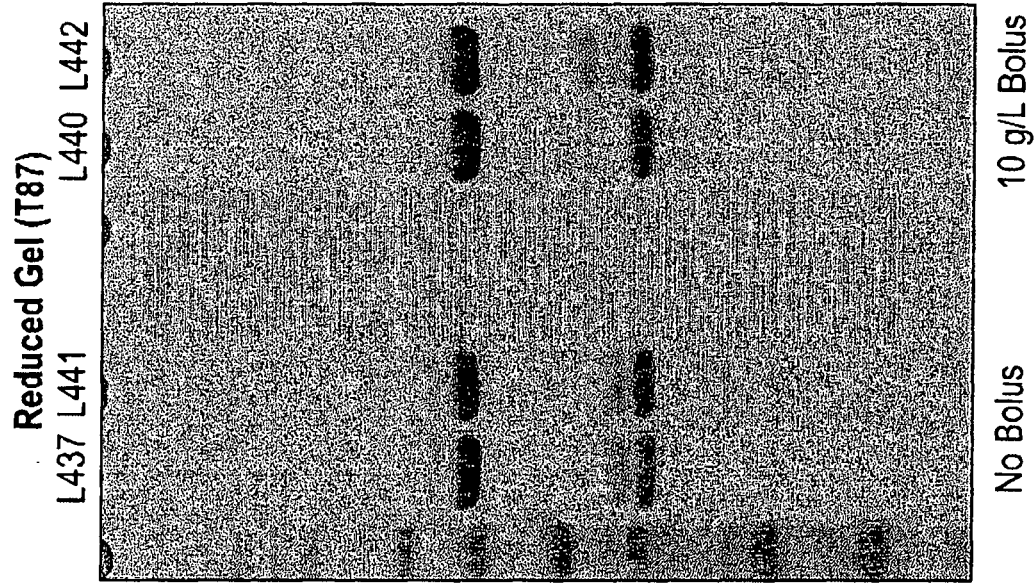
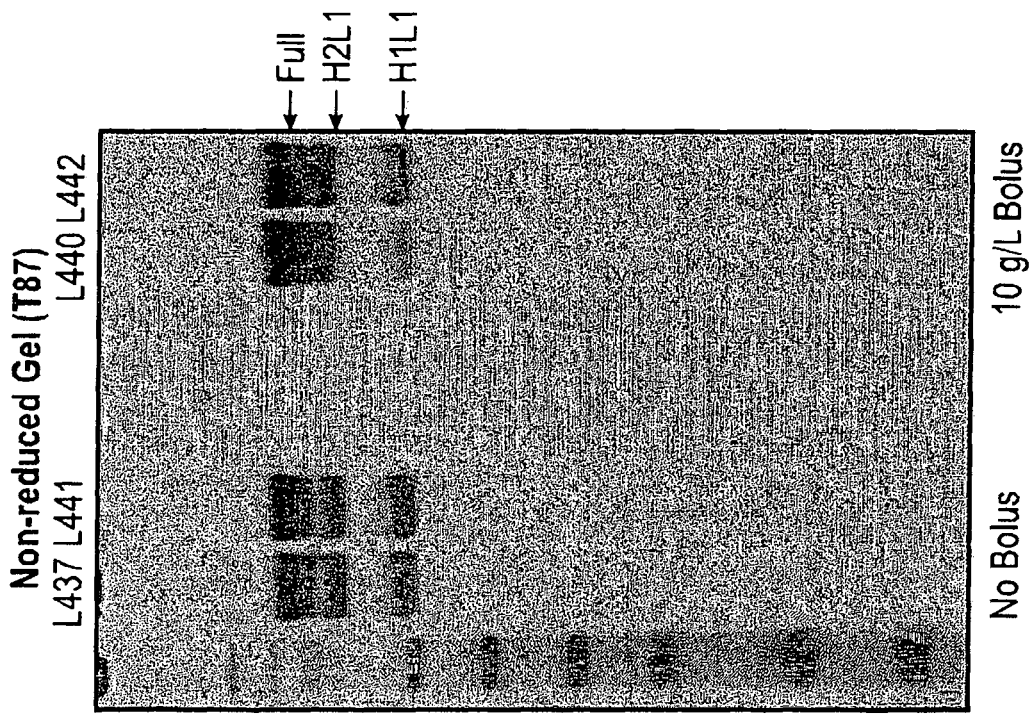


FIG. 4A



**FIG. 4D**



**FIG. 4C**

**H1L1 Abundance (T67)**

<b>Run</b>	<b>Time Point</b>	<b>Ethanol Bolus</b>	<b>H1L1 Band</b>
L437	T67	None	9427
L441	T67	None	7283
L440	T67	10 g/L	1220
L442	T67	10 g/L	3269

**FIG. 4E****H1L1 Abundance (T87)**

<b>Run</b>	<b>Time Point</b>	<b>Ethanol Bolus</b>	<b>H1L1Band</b>
L437	T86	None	10360
L441	T86	None	12022
L440	T86	10 g/L	6140
L442	T86	10 g/L	8726

**FIG. 4F**

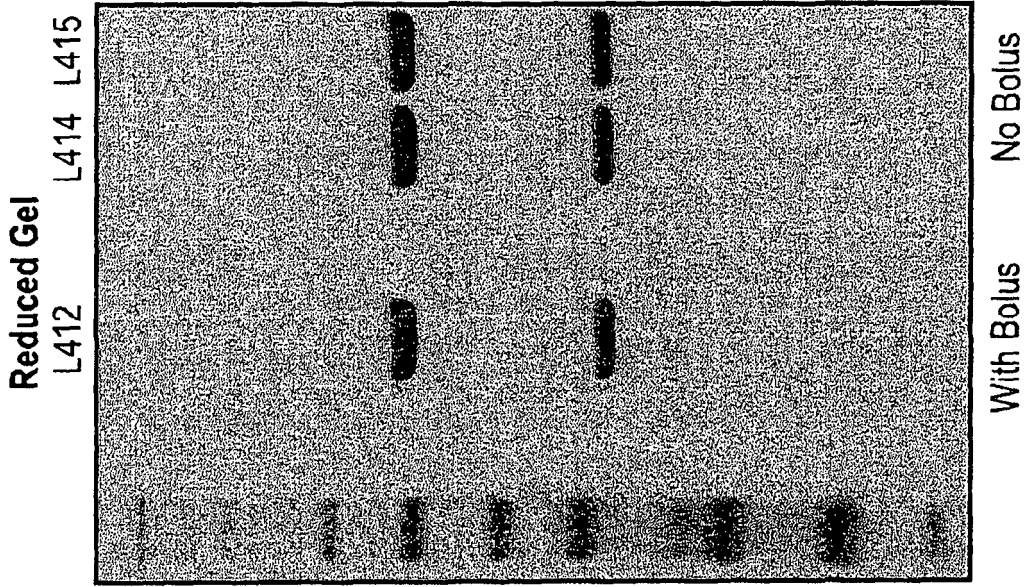


FIG. 5B

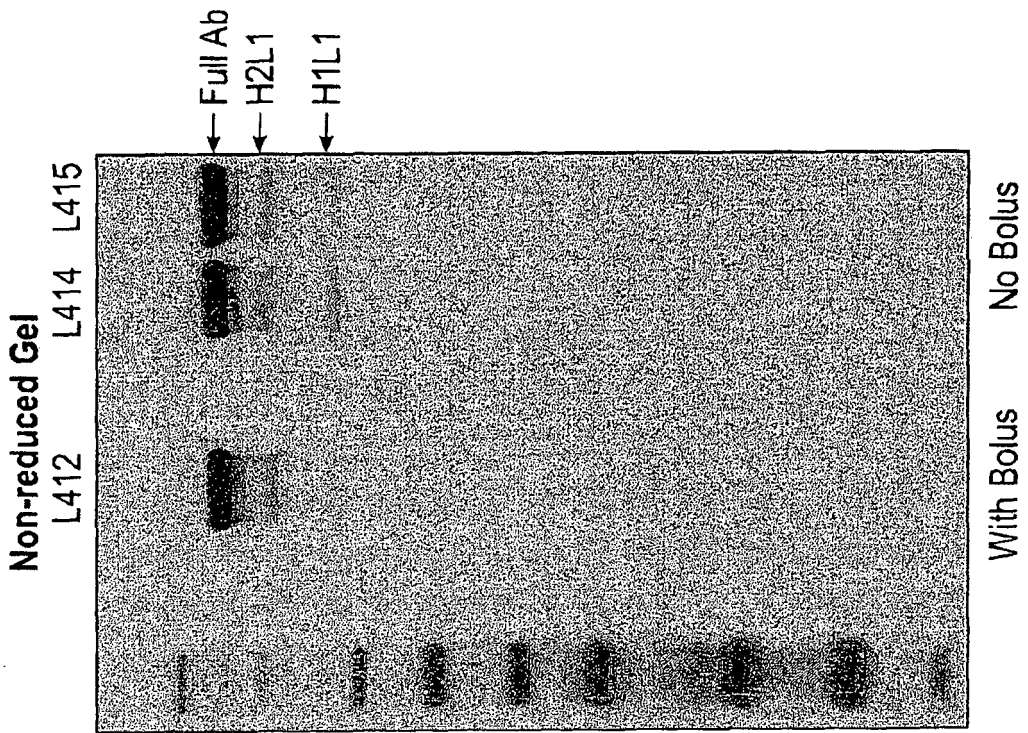
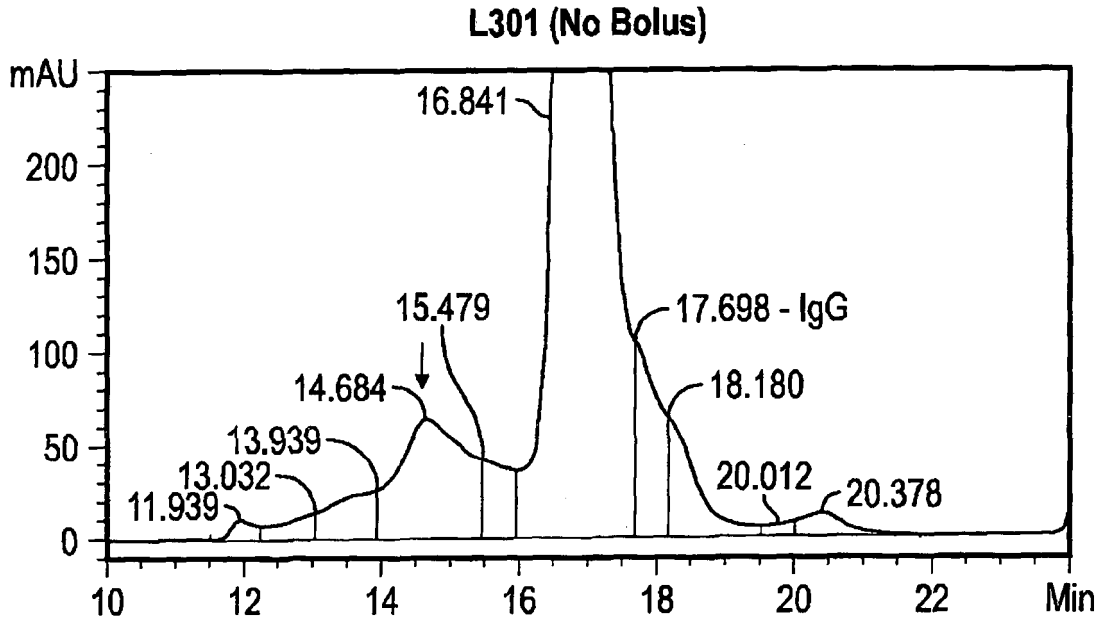


FIG. 5A

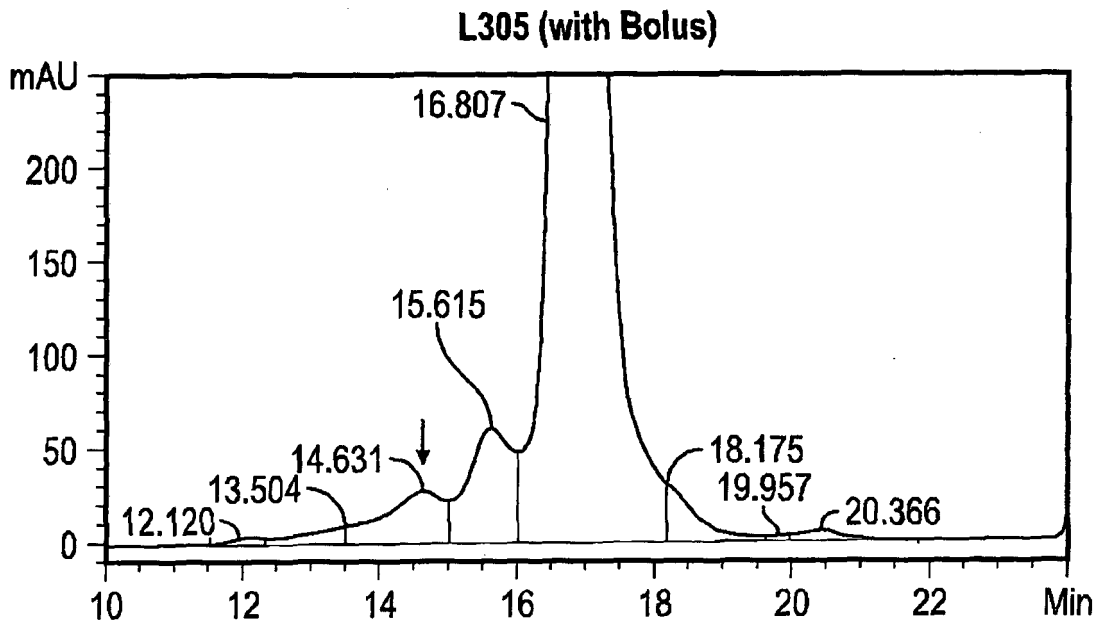
**H1L1 Abundance**

<b>Run</b>	<b>Time Point</b>	<b>Ethanol Bolus</b>	<b>H1L1 Band</b>
L412	T86	10 g/L	1177
L414	T86	None	3770
L415	T86	None	2219

**FIG. 5C**



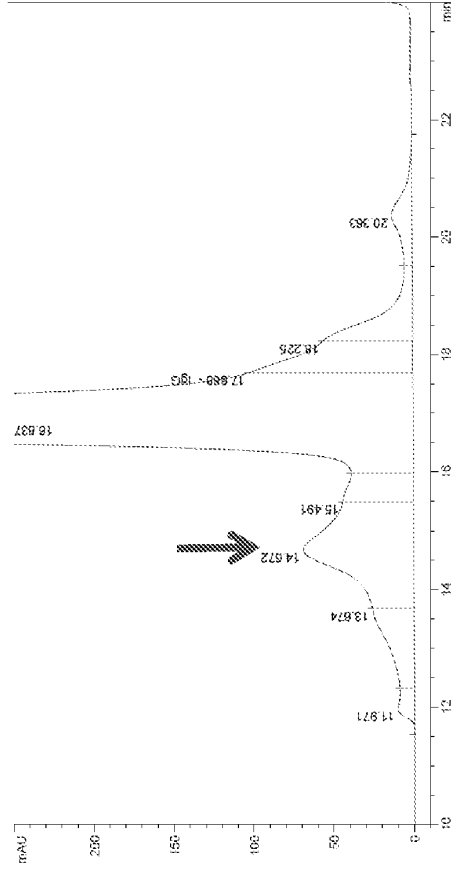
**FIG. 6A**



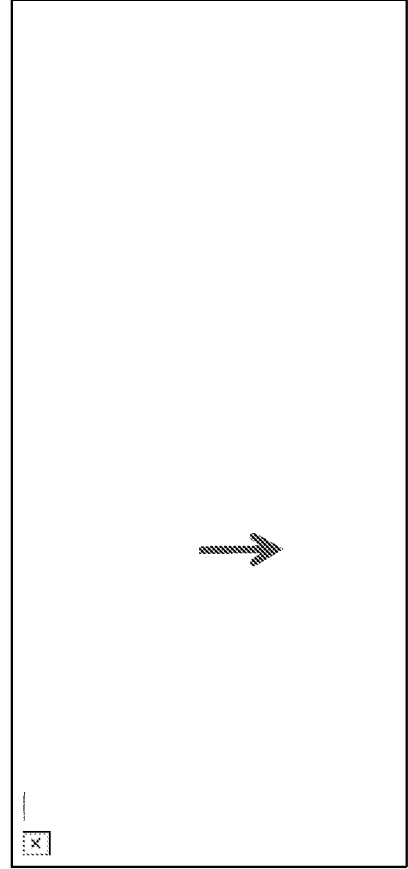
**FIG. 6B**

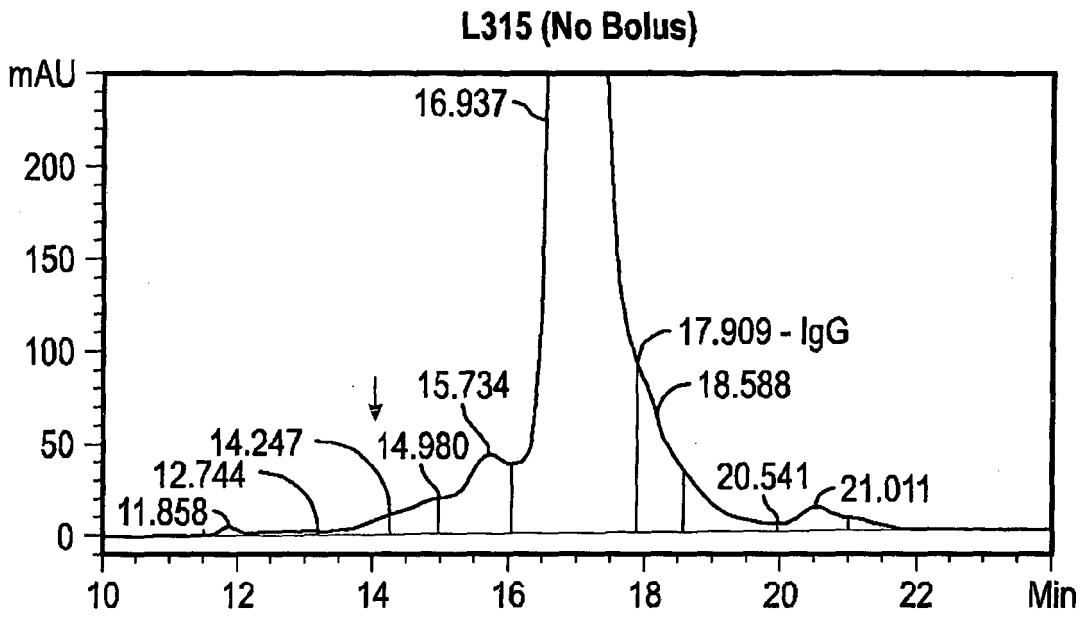
FIG. 6 (continued)

C. L302 (No Bolus)

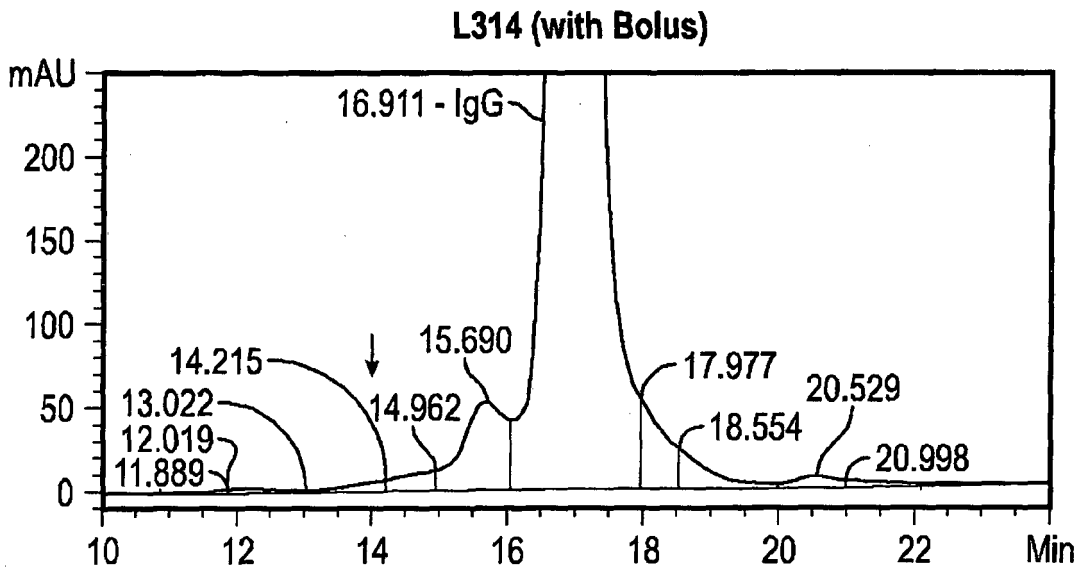


D. L311 (With Bolus)





**FIG. 6E**



**FIG. 6F**

<b>Run Number</b>	<b>Run Set</b>	<b>Ethanol Bolus</b>	<b>Sampled Elapsed Fermentation Time</b>	<b>SEC Main Peak % (Desired Antibody)</b>
L301	1	None	T97	78%
L302	1	None	T97	79%
<b>L305</b>	<b>1</b>	<b>10 g/L</b>	<b>T97</b>	<b>90%</b>
<b>L311</b>	<b>2</b>	<b>10 g/L</b>	<b>T97</b>	<b>94%</b>
L315	3	None	T87	87%
<b>L314</b>	<b>3</b>	<b>10 g/L</b>	<b>T87</b>	<b>91%</b>
<b>L399</b>	<b>4</b>	<b>10 g/L</b>	<b>T86</b>	<b>91%</b>
<b>L401</b>	<b>4</b>	<b>10 g/L</b>	<b>T86</b>	<b>87%</b>
L402	4	None	T86	93%
L403	4	None	T86	74%
L404	4	None	T86	71%

**FIG. 7**

Run Number	Ethanol Bolus	Sampled Elapsed Fermentation Time	SEC Main Peak % (Desired Antibody)
L437	None	T67	71%
L441	None	T67	81%
L440	10 g/L	T67	80%
L442	10 g/L	T67	80%
L437	None	T87	59%
L441	None	T87	61%
L440	10 g/L	T87	77%
L442	10 g/L	T87	68%

FIG. 8

Run Number	Ethanol Bolus	Sampled Elapsed Fermentation Time	SEC Main Peak % (Desired Antibody)
L412	10 g/L	T85	89%
L414	None	T85	88%
L415	None	T85	89%

FIG. 9

Observed H1L1 Band	Relative Half Antibody (T17H Peptide) Percentage
+	2.3%
++++	26.1%

FIG. 10

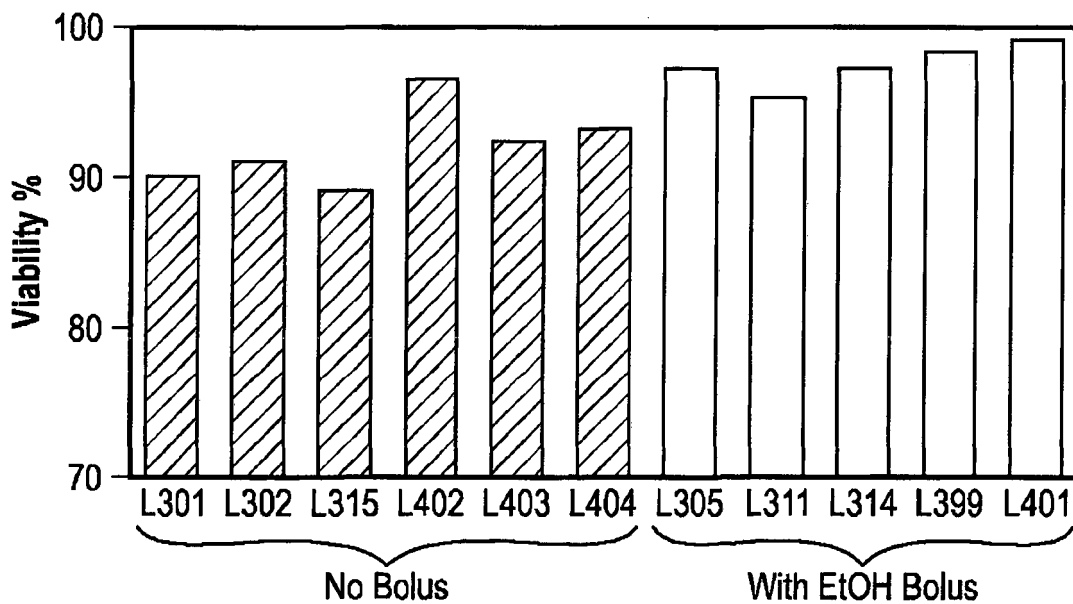


FIG. 11

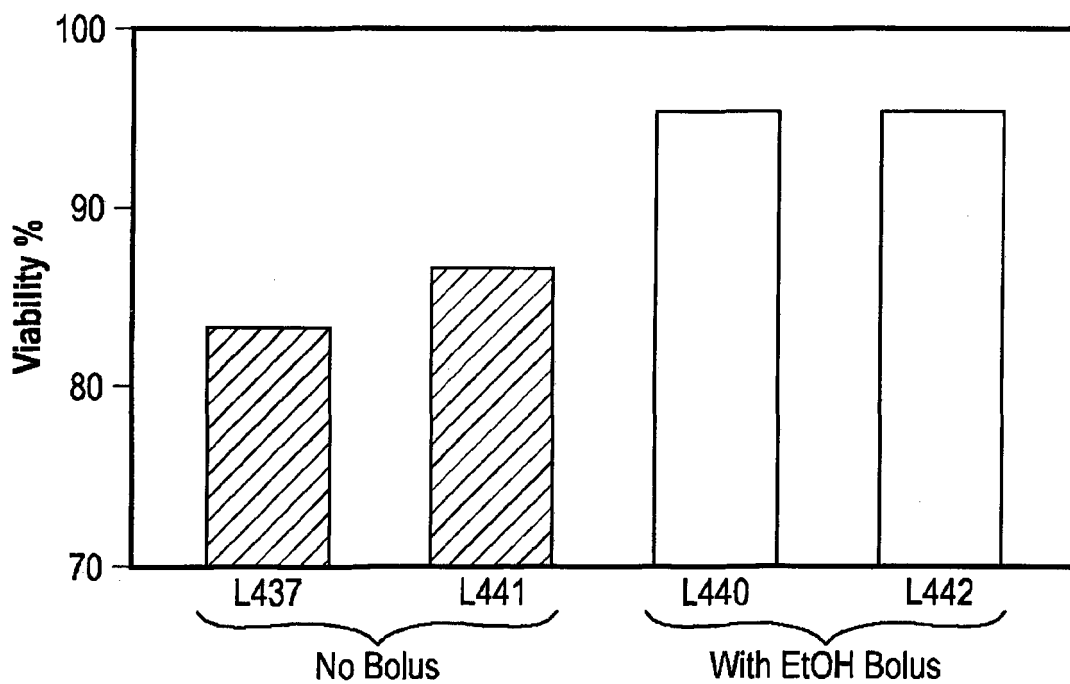


FIG. 12

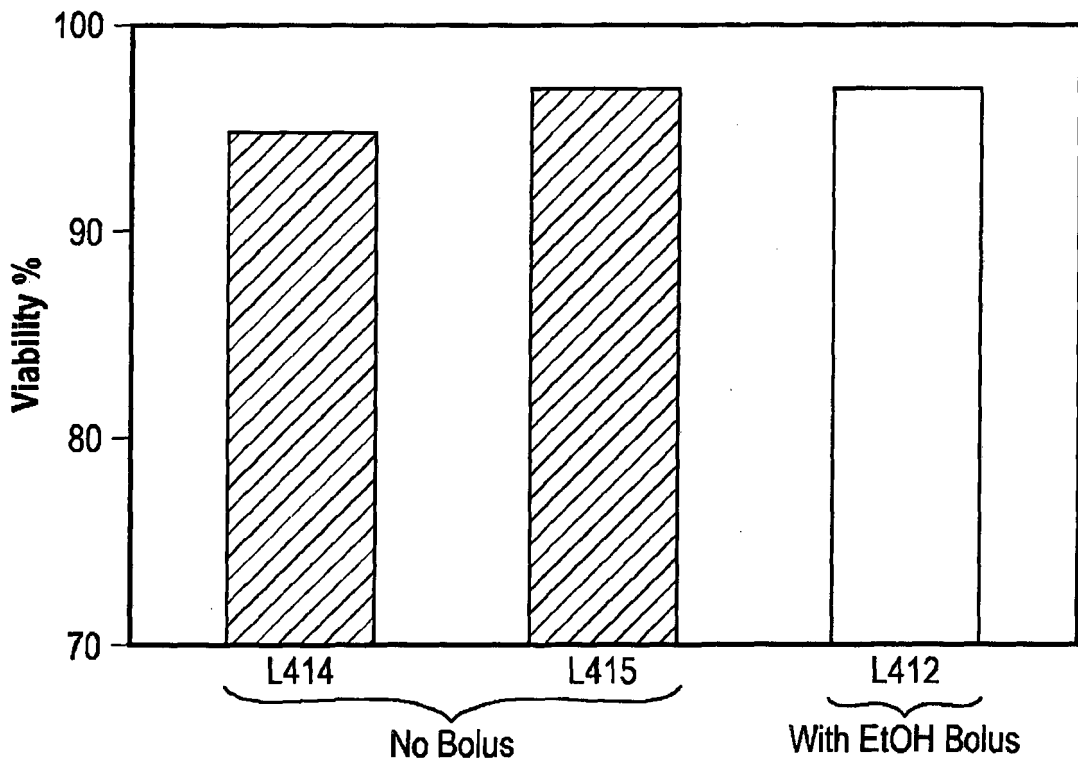
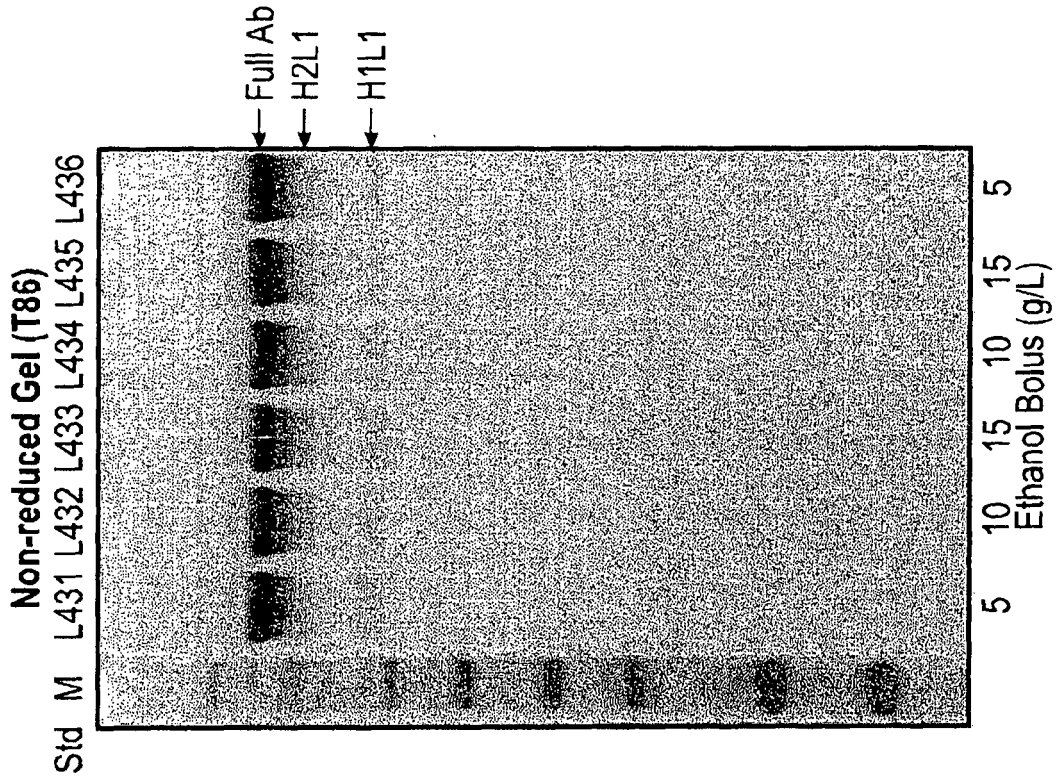
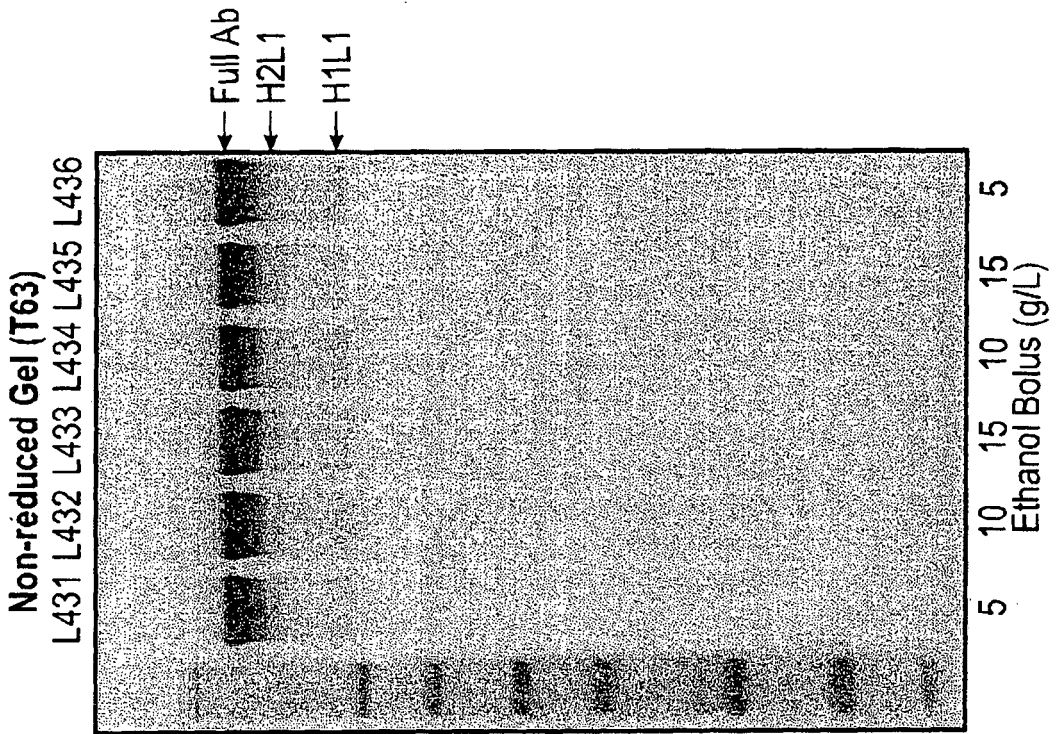


FIG. 13



**FIG. 14B**



**FIG. 14A**

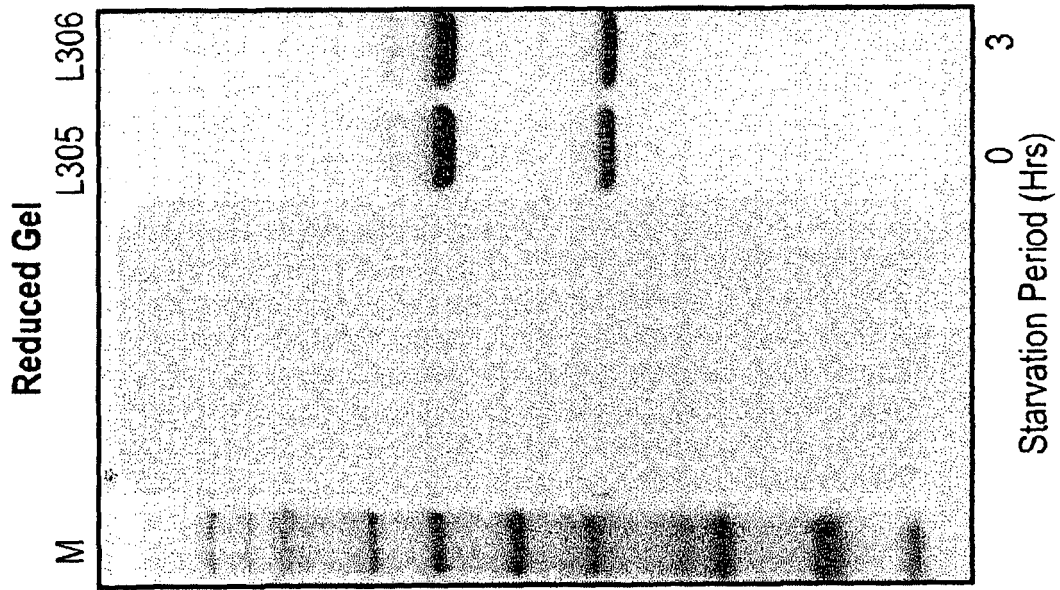


FIG. 15B

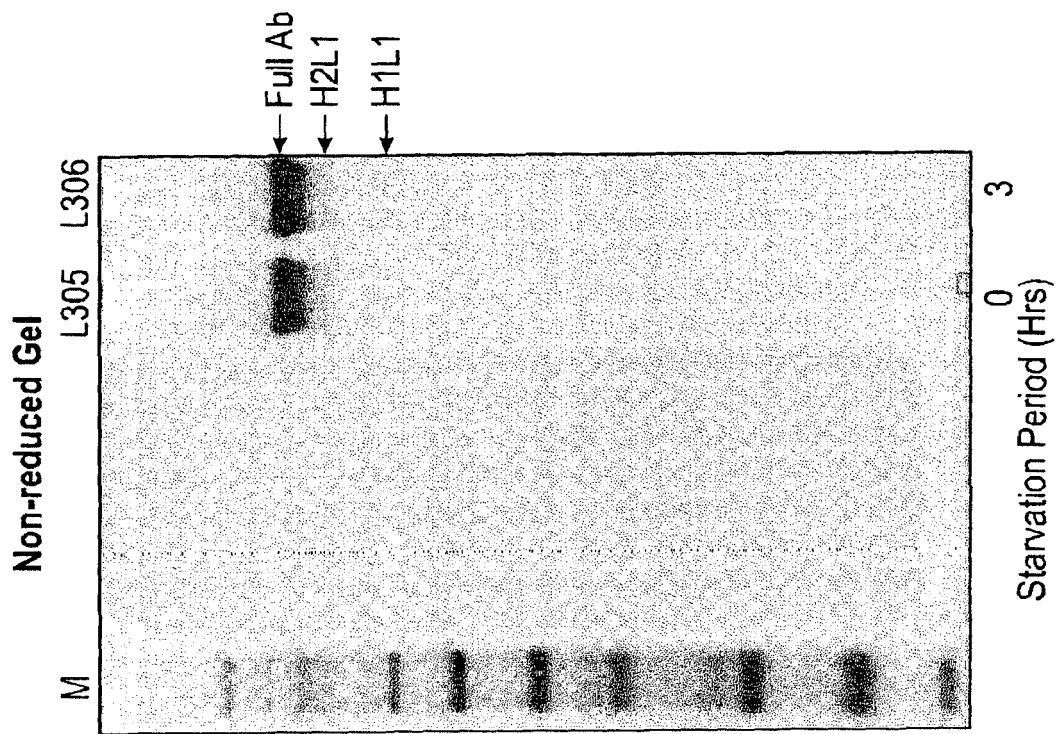
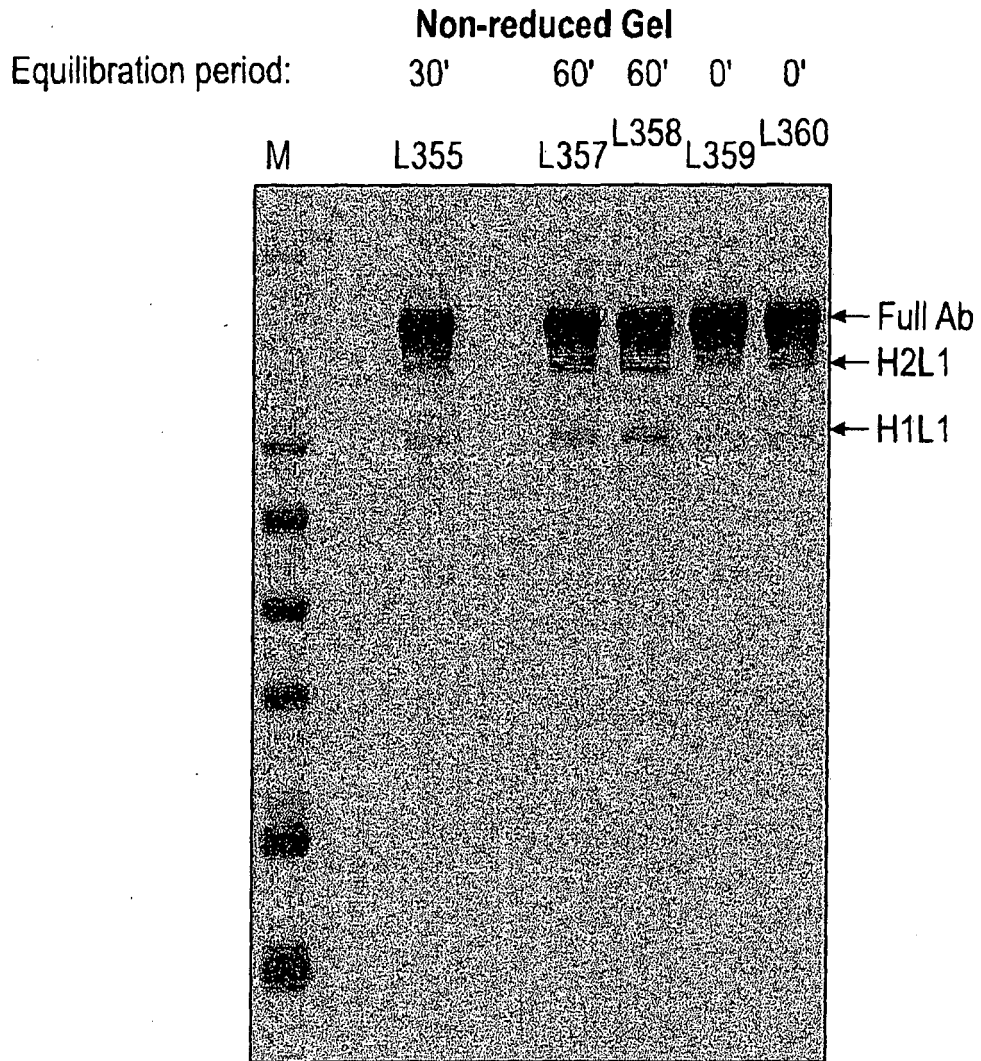
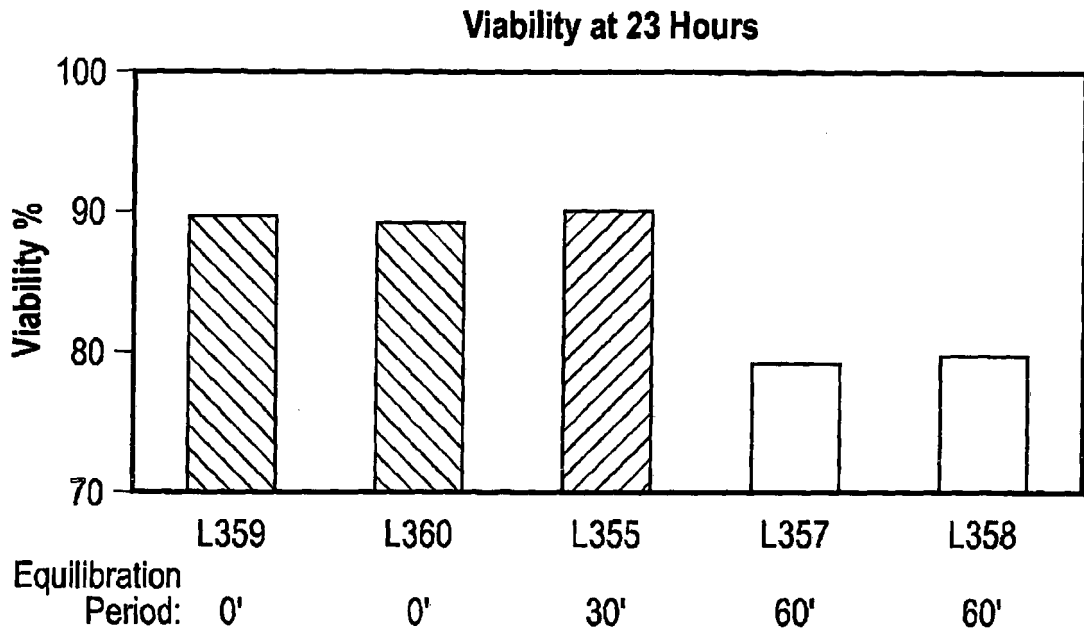


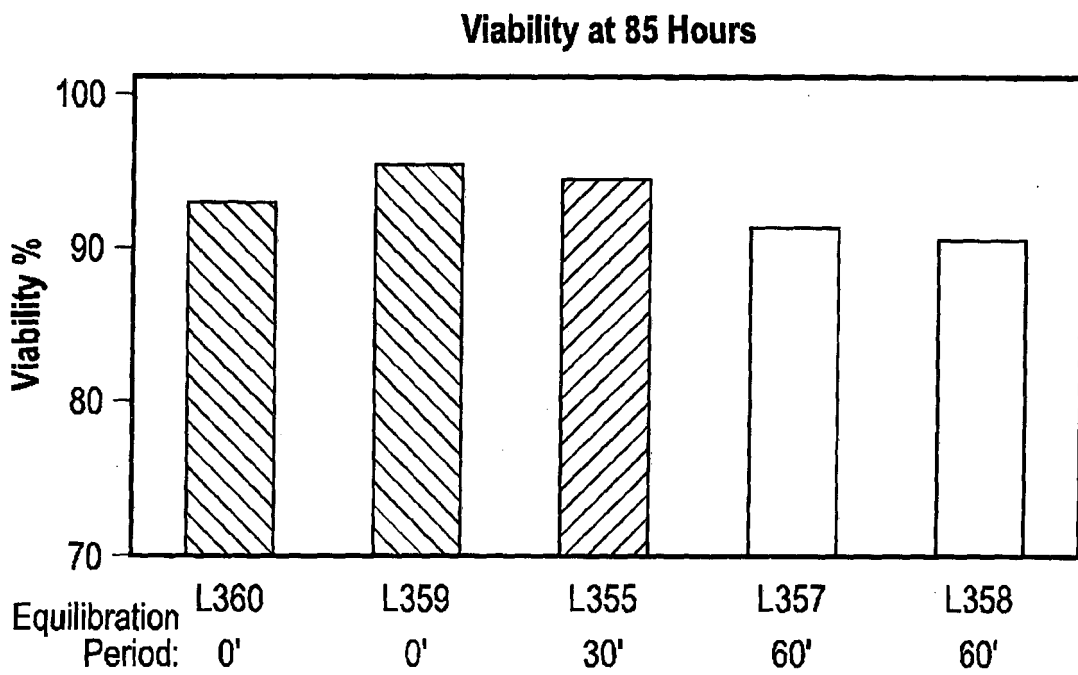
FIG. 15A



**FIG. 16A**



**FIG. 16B**



**FIG. 16C**