



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 948**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03779091 .2**
96 Fecha de presentación : **08.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1556083**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2005**

54 Título: **Procedimientos para tratar dolor postquirúrgico mediante la administración de un anticuerpo frente al factor de crecimiento nervioso y composiciones que contienen el mismo.**

30 Prioridad: **08.10.2002 US 417237 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.05.2011

73 Titular/es: **RINAT NEUROSCIENCE Corp.**
230 East Grand Avenue
South San Francisco, California 94080, US

72 Inventor/es: **Shelton, David, L. y**
Vergara, German, J.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 948 T3

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

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) para su uso en la prevención, la mejora o el tratamiento de dolor postquirúrgico.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El factor de crecimiento nervioso (NGF) fue la primera neurotrofina que se detectó y se ha caracterizado bien su papel en el desarrollo y supervivencia de neuronas tanto periféricas como centrales. Se ha demostrado que NGF es un factor crítico de supervivencia y mantenimiento en el desarrollo de neuronas sensoriales embrionarias y simpáticas periféricas y de neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (Smeyne, *et al.*, Nature 368:246-249 (1994); Crowley, *et al.*, Cell 76:1001-1011 (1994)). El NGF regula por incremento la expresión de neuropéptidos en neuronas sensoriales (Lindsay, *et al.*, Nature 337:362-364 (1989)), y su actividad está mediada a través de dos diferentes receptores unidos a la membrana, el receptor de tirosina cinasa TrkA y el receptor p75 que está estructuralmente relacionado con otros miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (Chao, *et al.*, Science 232:518-521 (1986)).

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

25 El NGF se produce mediante varios tipos de células incluyendo mastocitos (Leon, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3739-3743 (1994)), linfocitos B (Torcia, *et al.*, Cell 85:345-356 (1996)), queratinocitos (Di Marco, *et al.*, J. Biol. Chem. 268:22838-22846)), células de músculo liso (Ueyama, *et al.*, J. Hypertens. 11:1061-1065 (1993)), fibroblastos (Lindholm, *et al.*, Eur. J. Neurosci. 2:795-801 (1990)), células epiteliales bronquiales (Kassel, *et al.*, Clin. Exp. Allergy 31:1432-40 (2001)), células mesangiales renales (Steiner, *et al.*, Am. J. Physiol. 261:F792-798 (1991)) y miotubos del músculo esquelético (Schwartz, *et al.*, J Photochem, Photobiol. B 66:195-200 (2002)). Se han encontrado receptores de NGF en una variedad de tipos de células fuera del sistema nervioso. Por ejemplo, se ha encontrado TrkA en mastocitos, linfocitos T y B y monocitos humanos.

30 Se ha observado una asociación entre un aumento de los niveles de NGF y una variedad de estados inflamatorios en pacientes humanos así como también en varios modelos animales. Éstos incluyen lupus eritematoso sistémico (Bracci-Laudiero, *et al.*, Neuroreport 4:563-565 (1993)), esclerosis múltiple (Bracci-Laudiero, *et al.*, Neurosci. Lett. 147:9-12 (1992)), psoriasis (Raychaudhuri, *et al.*, Acta Derm. l'enereol. 78:84-86 (1998)), artritis (Falcimi, *et al.*, Ann. Rheum. Dis. 55:745-748 (1996)), cistitis intersticial (Okragly, *et al.*, J. Urology 161:438-441 (1991)) y asma (Braun, *et al.*, Eur. J Immunol. 28:3240-3251 (1998)).

40 Consecuentemente, un nivel elevado de NGF en tejidos periféricos está asociado con la inflamación y se ha observado en varias formas de artritis. El sinovio de pacientes afectados por artritis reumatoide expresa altos niveles de NGF, mientras que se ha notificado que en el sinovio no inflamado NGF es indetectable (Aloe, *et al.*, Arch. Rheum. 35:351-355 (1992)). Se observaron resultados similares en ratas con artritis reumatoide inducida experimentalmente (Aloe, *et al.*, Clin. Exp. Rheumatol. 10:203-204 (1992)). Se han notificado niveles elevados de NGF en ratones artríticos transgénicos junto con un aumento del número de mastocitos. (Aloe, *et al.*, Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects 15:139-143 (1993)).

45 El tratamiento con NGF exógeno conduce aun aumento del dolor y sensibilidad al dolor. Esto se ilustra mediante el hecho de que la inyección de NGF conduce a un aumento significativo del dolor y la sensibilidad al dolor tanto en modelos animales (Amann, *et al.*, Pain 64, 323-329 (1996); Andreev, *et al.*, Pain 63, 109-115 (1995)) como ser humano (Dyck, *et al.*, Neurology 48, 501-505 (1997); Petty, *et al.*, Annals Neurol. 36, 244-246 (1994)). El NGF parece actuar mediante múltiples mecanismos incluyendo la inducción de la neurotrofina BDNF (Apfel, *et al.*, Mol. Cell. Neurosci. 7(2), 134-142 (1996); Michael, *et al.*, J. Neurosci 17, 8476-8490 (1997)) que a su vez cambia el procesamiento de señal de dolor en la médula espinal (Hains, *et al.*, Neurosci Lett. 320(3), 125-8 (2002); Miletic, *et al.*, Neurosci Lett. 319(3), 137-40 (2002); Thompson, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 96(14), 7714-8 (1999)), la inducción de cambios en las conexiones central y periférica de las neuronas sensoriales y otras neuronas de transmisión de dolor en la médula espinal (Lewin, *et al.*, European Journal of Neuroscience 6, 1903-1912 (1994); Thompson, *et al.*, Pain 62, 219-231 (1995)), la inducción de cambios en el crecimiento axonal (Lindsay, RM, J Neurosci. 8(7), 2394-405 (1988)), la inducción de la expresión del receptor de bradicinina (Peterson *et al.*, Neuroscience 83:161-168 (1998)), la inducción de cambios en la expresión de genes responsables de la conducción y activación nerviosa tales como canales iónicos (Boettger, *et al.*, Brain 125(Pt 2), 252-63 (2002); Kerr, *et al.*, Neuroreport 12(14), 3077-8 (2001); Gould, *et al.*, Brain Res 854(1-2), 19-29 (2000)), la potenciación del receptor VR1

relacionado con el dolor (Chuang, *et al.*, Nature 411 (6840), 957-62 (2001); y la provocación de cambios patológicos en músculos (Foster, *et al.*, J Pathol 197(2), 245-55 (2002)). Muchos de estos cambios tienen lugar directamente en las neuronas sensoriales que transmiten el dolor y aparentemente no dependen de la inflamación concomitante. Además, existen al menos otros dos tipos de células que se sabe que responden a NGF y que pueden estar implicadas en cambios de sensibilidad al o sensación de dolor. Se ha notificado que el primero de ellos, el mastocito, responde a NGF con desgranulación (Yan, *et al.*, Clin. Sci. (Lond) 80:565-569 (1991)) o, en otros estudios, provoca o aumenta la producción o liberación de mediador en colaboración con otros agentes (Pearce y Thompson, J. Physiol. 372:379-393 (1986), Kawamoto, *et al.*, J. Immunol. 168:6412-6419 (2002)). Se ha demostrado claramente en la rata que las respuestas al dolor mediadas con NGF están al menos un tanto mediadas por mastocitos (Lewin, *et al.*, Eur. J. Neurosci. 6:1903-1912 (1994), Woolf, *et al.*, J. Neurosci. 16:2716-2723 (1996) aunque la posible relevancia de esto queda por demostrarse en seres humanos. También se sabe que las neuronas simpáticas primarias responden a NGF y que también están implicadas en la señalización del dolor (Aley, *et al.*, Neuroscience 71:1083-1090 (1996)). Está claro que la eliminación de inervación simpática modifica la hiperalgesia normalmente observada en respuesta al tratamiento con NGF (Woolf, *et al.*, J. Neurosci. 16: 2716-2723 (1996)).

Cada año se someten a procedimientos quirúrgicos veintitrés millones de pacientes. El dolor está localizado normalmente dentro de la proximidad del sitio quirúrgico. El dolor postquirúrgico puede tener dos aspectos clínicamente importantes, concretamente el dolor en reposo, o dolor que se produce cuando el paciente no está moviéndose y el dolor mecánico que se exagera mediante el movimiento (toser/estornudar, salir de la cama, fisioterapia, etc.). El principal problema con la gestión del dolor postquirúrgico para cirugía mayor es que los fármacos usados actualmente tienen una variedad de efectos secundarios prominentes que retrasan la recuperación, prolongan la hospitalización y someten a ciertos grupos de pacientes vulnerables al riesgo de complicaciones graves. El dolor postquirúrgico, o dolor que se produce tras cirugía o lesión traumática es un problema médico grave y con frecuencia intratable.

Existen dos categorías de medicación generales para el tratamiento del dolor, las cuales tienen desventajas. La primera categoría incluye los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que se usan para tratar el dolor leve o moderado, pero cuyo uso terapéutico está limitado por efectos gastrointestinales no deseables tales como erosión gástrica, la formación de úlcera péptica o la inflamación del duodeno o del colon. Los AINE también pueden provocar toxicidad renal con el uso prolongado, y además, tal como se describe a continuación, no son muy eficaces para tratar dolor asociado con o que surge a partir de ciertos estados, incluyendo dolor postquirúrgico. La segunda categoría incluye morfina y opioides relacionados que se usan para tratar el dolor de moderado a grave pero cuyo uso terapéutico está limitado debido a efectos no deseables tales como sedación, confusión, estreñimiento, depresión respiratoria, cólico renal, tolerancia a uso prolongado y el riesgo de adicción. Por tanto se necesitan compuestos útiles para tratar el dolor con menos o ningún efecto secundario.

Con frecuencia se categoriza el dolor como "inflamatorio", "neuropático" o "visceral", pero estas etiquetas generales tradicionales tienen problemas inherentes. Implican identidad o similitud mecanicista entre todas las fuentes de dolor dentro de una de estas categorías muy generales. De hecho, existen muchos tipos diferentes de dolor inflamatorio y fuentes de dolor que no son ni inflamatoria ni neuropática. Además, los tipos de dolor que tienen un componente inflamatorio y/o se denominan tradicionalmente "inflamatorios" no significa que otros aspectos fisiológicos no contribuyan al estado de dolor. Por ejemplo, tanto la artrosis como la cistitis intersticial se definirían por sus nombres como estados inflamatorios estériles de respectivamente articulaciones o la vejiga urinaria, pero está claro que los dolores asociados con estos dos estados son bastante diferentes de manera mecanicista entre sí. Esto se indica por los efectos variables de un tipo dado de medicación analgésica con respecto a estos tipos de dolor. La mayoría de pacientes con artrosis reciben un buen alivio del dolor (al menos inicialmente) con AINE. Sin embargo, el tratamiento con AINE es completamente ineficaz con la cistitis intersticial.

El dolor postquirúrgico (denominado de manera intercambiable, dolor postincisional) se considera con frecuencia una variedad de dolor inflamatorio. Aunque puede haber un componente "inflamatorio" con respecto al dolor quirúrgico, están implicados claramente mecanismos adicionales. Por ejemplo, durante la cirugía u otra lesión, tanto la vasculatura como los nervios se cortan o se desgarran. Esto no ocurre en un tejido que experimenta sólo inflamación. Está claro que el corte de un nervio puede inducir una actividad continua que se percibe como dolorosa. Además, la sección de vasos sanguíneos conduce a un tejido que es relativamente isquémico, también un estímulo doloroso que no está presente durante la inflamación sola.

Los diferentes mecanismos implicados en el dolor inducido por lesión o quirúrgico en comparación con la inflamación se dan como ejemplo mediante la farmacología variable y los sustratos anatómicos subyacentes de alivio del dolor en los dos estados. Yamamoto, *et al.*, (Brian Res. 909(1-2):138-144 (2001)) han demostrado que la dipeptidasa ácida unida a N-acetil-alfa (NAALADasa) espinal provoca una atenuación marcada del dolor mecánico que acompaña al estímulo inflamatorio de la inyección de carragenano. Sin embargo, en experimentos paralelos en los que NAALADasa se inhibe de un modo idéntico tras una incisión, no hubo ninguna atenuación de dolor mecánico. Estas observaciones demuestran que la bioquímica o farmacología subyacente al dolor postquirúrgico se distingue de la subyacente al dolor inflamatorio. Las estructuras anatómicas importantes en la modulación de la sensación de dolor también se han examinado en estados de dolor postquirúrgico y otros (Pogatzki, *et al.*, Anesthesiology, 96(5):1153-1160 (May 2002)). Influencias descendentes del tronco encefálico, más específicamente de la médula media rostral, son importantes moduladores de la hiperalgesia secundaria en estados de dolor visceral,

neuropático e inflamatorio generales. Cuando se lesionó la zona del tronco encefálico, no se observó ningún cambio en ninguna respuesta de dolor medida tras la incisión. Estos resultados indican que la hiperalgesia primaria y secundaria tras una incisión no están moduladas mediante la influencia descendente a partir de RMM. La falta de contribución de influencias facilitadoras descendentes a partir de RMM a la hiperalgesia secundaria tras la incisión del gastrocnemio respalda el conocimiento de que el dolor inducido por incisión implicaba mecanismos diferentes en comparación con el dolor inflamatorio y neuropático. Además de las diferencias obvias en el dolor inducido por lesión o postquirúrgico del dolor inflamatorio, visceral o neuropático, estos resultados demuestran que los mecanismos implicados en el dolor postquirúrgico (o dolor inducido por lesión) son claramente diferentes de otros dolores. Además, la utilidad de una intervención farmacológica particular (u otra) en el tratamiento del dolor postquirúrgico no puede predecirse sometiendo a prueba ese agente o esa intervención farmacológicas en los modelos de dolor inflamatorio, visceral o neuropático.

La desaparición del dolor en reposo y la persistencia de dolor con las actividades y en respuesta a estímulos mecánicos en el sitio de la herida también están presentes en pacientes tras la cirugía. (Moiniche, *et al.*, *Acta Anaesthesiol. Scand.* 41:785-9 (1997)). Los estudios sugieren que el dolor en reposo y el dolor evocado provocados mediante incisiones probablemente se transmiten mediante diferentes receptores y/o diferentes poblaciones de fibras aferentes. De manera distinta al uso de anestésicos locales para inhibir estas respuestas evocadas, están disponibles pocos fármacos que reducen notablemente el dolor con la tos y el movimiento tras cirugía.

Se ha demostrado que el pretratamiento con un anestésico local para bloquear el dolor durante la incisión experimental previene inicialmente el dolor continuo y la hiperalgesia mecánica primaria. El dolor de las incisiones también desaparece cuando se inyecta lidocaína tras la lesión. Sin embargo, a medida que disminuye el efecto anestésico local, vuelve la hiperalgesia primaria. En pacientes, las inyecciones anestésicas locales realizadas antes de la cirugía son aproximadamente equivalentes para reducir el dolor a las inyecciones realizadas tras la cirugía. (Moiniche, *et al.*, *Anesthesiology* 96:725-41 (2002))

Los experimentos de estudios clínicos en voluntarios humanos y un modelo de incisión preclínico coinciden en que la administración de anestesia local antes o después de la incisión son aproximadamente equivalentes. La activación de neuronas de transmisión de dolor central durante la incisión y la sensibilización no son necesarias para comportamientos de dolor varios días después. Más bien, para incisiones, la capacidad de respuesta potenciada de neuronas centrales y el dolor requieren aferencia continua a partir de la incisión. Después de que disminuya cualquier tratamiento analgésico previo a la incisión, parece que la herida quirúrgica puede reiniciar la sensibilización y regenerar las respuestas de dolor. (Pogatzki, *et al.*, *J Neurophysiol* 87:721 (2002))

También se ha asignado la zona de hiperalgesia (incluyendo la zona no lesionada) provocada mediante las incisiones. La hiperalgesia secundaria (hiperalgesia fuera de la zona lesionada) es una medida de capacidad de respuesta potenciada del sistema nervioso central, es decir la sensibilización central. Se ha observado que la zona de vasodilatación o enrojecimiento (posiblemente un resultado de reflejos de axón) provocada mediante la incisión se diferenciaba de la zona de hiperalgesia. A diferencia del dolor en reposo y la hiperalgesia mecánica primaria, la gran zona de hiperalgesia no se desarrolló cuando se realizó la inyección anestésica local antes la incisión. Además, podría no revertirse mediante la inyección anestésica local tras la incisión. En pacientes tras la cirugía, en algunos casos, ciertos tratamiento reducen mucho la zona de hiperalgesia pero no modifican mucho las medidas clínicas de dolor postquirúrgico (intensidades de dolor y consumo de opioides). Se ha demostrado que la reducción de la zona de hiperalgesia tras colectomía no redujo mucho el dolor agudo pero estaba asociado con una reducción del número de pacientes que desarrollaron dolor residual incluso hasta 6 meses tras la colectomía. (De Kock, *et al.*, *Pain* 92:373-80 (2001)).

Se ha descrito el uso del anticuerpo anti-NGF para tratar el dolor visceral crónico. Véase la publicación PCT n.º WO 01/78698. Brennan *et al.* notifican la administración de la inmunoadhesina de TrkA (proteína de fusión a trkAlG) en un modelo de rata de dolor postquirúrgico. Véase Society for Neuroscience Abstracts 24(1-2) 880 (1998).

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento de que antagonistas de NGF son eficaces en el tratamiento del dolor postquirúrgico. El tratamiento se refiere a uno o más aspectos de dolor postquirúrgico tal como se describen en el presente documento.

En un aspecto, la invención caracteriza un anticuerpo anti-NGF para su uso en el tratamiento de dolor postquirúrgico (denominado de manera intercambiable "dolor postraumático" o "postincisional"). Se ha demostrado según la invención que antagonistas de NGF pueden inhibir o bloquear el dolor resultante del dolor postquirúrgico, incluyendo dolor a partir de cirugía o a partir de una herida traumática o incisional.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF para su uso para reducir la incidencia de dolor postquirúrgico, mejorar el dolor postquirúrgico, paliar el dolor postquirúrgico; y/o retrasar el desarrollo o evolución de dolor postquirúrgico en un individuo.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF para su uso para aumentar el umbral de

dolor en un individuo que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF para su uso para potenciar la recuperación de una herida traumática inducida por lesión y/o cirugía en un individuo que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF.

5 En algunas realizaciones, el dolor en reposo se suprime, mejora y/o previene, en algunas realizaciones, el dolor inducido mecánicamente (incluyendo el dolor resultante de movimiento) se suprime, mejora y/o previene, y en alguna realización, el dolor inducido térmicamente se suprime, mejora y/o previene. En algunas realizaciones, el dolor inducido mecánicamente se suprime, mejora y/o previene mediante la administración de un anticuerpo anti-NGF. En algunas realizaciones, el dolor en reposo se suprime, mejora y/o previene mediante la administración de un anticuerpo anti-NGF. En alguna realización, el dolor inducido térmicamente se suprime, mejora y/o previene mediante la administración de un anticuerpo anti-NGF. En algunas realizaciones, la alodinia (es decir, un aumento de respuesta (es decir, un aumento de la sensación nociva) a un estímulo normalmente no nocivo)) se suprime, mejora y/o previene, y/o la hiperalgesia (es decir, un aumento de respuesta a un estímulo desagradable o normalmente nocivo) se suprime, mejora y/o previene. Todavía en realizaciones adicionales, la alodinia y/o la hiperalgesia es de naturaleza térmica o mecánica (táctil), o dolor en reposo. En algunas realizaciones, el dolor es dolor crónico. En otras realizaciones, el dolor está asociado con el sitio de incisión, herida o traumatismo, y/o está en, próximo o cercano al sitio de incisión, herida y/o traumatismo.

Un anticuerpo anti-NGF adecuado para su uso en los procedimientos de la invención es cualquier agente que puede dar como resultado directa o indirectamente una reducción de la actividad biológica de NGF. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-NGF se une a (interacciona físicamente con) NGF. En alguna realización, el anticuerpo anti-NGF se une a NGF (tal como hNGF) y no se une de manera significativa a neurotrofinas relacionadas, tales como NT-3, NT4/5 y/o BDNF. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF está humanizado (tal como anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es anticuerpo E3 (tal como se describe en el presente documento). En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende uno o más CDR de anticuerpo E3 (tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco, o, en algunas realizaciones, todos los seis CDR de E3). En otras realizaciones, el anticuerpo es humano. Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada mostrada en la tabla 1 (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera mostrada en la tabla 2 (SEQ ID NO:2). Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no provoca la lisis mediada por complementos, o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). En otras realizaciones, la región constante está modificada tal como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; publicación PCT n.º WO9958572 ; y/o solicitud de patente de RU n.º 9809951.8.

Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es un anticuerpo que se une específicamente a NGF (tal como NGF humano). Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo 6 de NGF que un anticuerpo seleccionado de uno cualquiera o más de los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón: Mab 911, MA b 912 y MA b 938 (véase Hongo, *et al.*, Hybridoma 19:215-227 (2000)). En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se une al receptor trkA. El anticuerpo anti-NGF puede ser un anticuerpo monoclonal anti-NGF humano (anti-hNGF) que puede unirse a hNGF e inhibir de manera eficaz la unión de hNGF a TrkA humano (hTrkA) y/o inhibir de manera eficaz la activación del receptor TrkA humano.

La afinidad de unión de un anticuerpo anti-NGF a NGF (tal como hNGF) puede ser de aproximadamente 0,10 nM a aproximadamente 1,0 nM, de aproximadamente 0,10 nM a aproximadamente 0,80 nM, de aproximadamente 0,15 nM a aproximadamente 0,75 nM y de aproximadamente 0,18 nM a aproximadamente 0,72 nM. En una realización, la afinidad de unión es entre aproximadamente 2 pM y 22 pM. En alguna realización, la afinidad de unión es aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es inferior a aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es aproximadamente 0,1 nM o inferior a aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es inferior a aproximadamente 0,1 nM, o inferior a aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o de aproximadamente 50 pM a cualquiera de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, o aproximadamente 40 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM, o inferior a aproximadamente 50 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es inferior a cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM. Todavía en otras realizaciones, la afinidad de unión es aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM, o superior a aproximadamente 40 pM. Tal como se conoce bien en la técnica, la afinidad de unión puede expresarse como KD, o constante de disociación, y un aumento de la afinidad de unión corresponde a una reducción de KD. La afinidad de unión de anticuerpo monoclonal de ratón anti-NGF 911 (Hongo *et al.*, Hybridoma 19:215-227 (2000) a NGF humano es aproximadamente 10 nM, y la afinidad de unión de anticuerpo anti-NGF humanizado E3 (descrito en el presente

documento) a NGF humano es aproximadamente 0,07 nM.

El anticuerpo anti-NGF puede ser para la administración antes de, durante y/o tras la cirugía, incisión y/o herida que provoca o está asociada con el dolor postquirúrgico. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se administra antes de la cirugía, incisión o herida. La administración de un anticuerpo anti-NGF puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo: por vía oral, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intraarterial, por vía intramuscular, por vía intracardiaca, por vía intraespinal, por vía intratorácica, por vía intraperitoneal, por vía intraventricular, por vía sublingual, y/o por vía transdérmica. En algunas realizaciones, la administración es mediante uno o más de los siguientes medios: por vía intravenosa, por vía subcutánea, mediante inhalación, por vía intraarterial, por vía intramuscular, por vía intracardiaca, por vía intraventricular y por vía intraperitoneal. La administración puede ser sistémica, por ejemplo por vía intravenosa, o localizada.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se administra en una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, y en otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se administra en una dosis de aproximadamente 0,3 mg/kg a 2,0 mg/kg de peso corporal.

En otro aspecto, la invención presenta una composición para tratar y/o prevenir el dolor postquirúrgico que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se une específicamente a la molécula de NGF.

En otro aspecto, la invención presenta un kit para su uso en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el kit comprende cualquiera de los anticuerpos anti-NGF descritos en el presente documento, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, el kit comprende además instrucciones para el uso del anticuerpo anti-NGF en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es una gráfica que representa el dolor en reposo acumulativo tal como se evalúa 24 horas antes de la cirugía ("referencia"), 2 horas tras la cirugía ("postcirugía") y 1 y 2 días tras la cirugía. "Control" se refiere a tratamiento sin anticuerpo anti-NGF, y "911" se refiere a animales tratados con 35 mg/kg de anticuerpo anti-NGF 911 (también denominado "Mab 911"). Hongo *et al.*, Hybridoma 19:215-227 (2000). El tratamiento con anticuerpo anti-NGF redujo significativamente el dolor en reposo postquirúrgico.

La figura 2 es una gráfica que representa el dolor térmico (hiperalgesia) tal como se evalúa 24 horas antes de la cirugía ("referencia"), 4 horas tras la cirugía ("postcirugía") y 1 y 2 días tras la cirugía. "Control" se refiere a tratamiento sin anticuerpo anti-NGF, y "911" se refiere a animales tratados con 35 mg/kg de anticuerpo anti-NGF 911. El tratamiento con anticuerpo anti-NGF redujo significativamente la hiperalgesia térmica postquirúrgica.

La figura 3 es una gráfica que representa el dolor mecánico (hiperalgesia) en respuesta a la estimulación mecánica tal como se evalúa 24 horas antes de la cirugía ("referencia"), 3 horas tras la cirugía ("postcirugía") y 1, 2 y 3 días tras la cirugía. "Control" se refiere a tratamiento sin anticuerpo anti-NGF, y "911" se refiere a animales tratados con anticuerpo anti-NGF 911. El tratamiento con 7 mg/kg de anticuerpo anti-NGF redujo el dolor inducido mecánicamente postquirúrgico.

La figura 4 es una gráfica que representa el dolor en reposo evaluado 24 horas tras la cirugía y que muestra que el tratamiento con 0,02 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,6 mg/kg o 1 mg/kg de anticuerpo anti-NGF humanizado E3 redujo el dolor. "*" indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,5$) del control negativo.

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

La figura 6 es una gráfica que representa el dolor en reposo evaluado 24 horas tras la cirugía y que muestra que el tratamiento con 5 mg/kg de anticuerpo anti-NGF 911 redujo significativamente el dolor en reposo ($p < 0,02$) cuando se inyectó 14 días antes de la cirugía.

La figura 7 es una gráfica que representa el dolor en reposo evaluado 24 horas tras la cirugía y que muestra que el tratamiento con 5 mg/kg de anticuerpo anti-NGF 911 redujo el dolor en reposo cuando se inyectó 21 días antes de la cirugía.

La figura 8 es una gráfica que representa la proporción de heridas intactas presentes tras la incisión y el tratamiento con solución salina, 1 mg/kg de anticuerpo anti-NGF 911, o el control positivo, ketorolaco. La proporción de heridas intactas tras el tratamiento con anticuerpo anti-NGF 911 no diferían de la proporción de heridas intactas tras el tratamiento con solución salina (control negativo). Por tanto, el tratamiento con anticuerpo anti-NGF no mostró ningún efecto sobre la cicatrización de heridas. Por el contrario, los animales tratados con AINE ketorolaco (control positivo) mostró una reducción significativa de la proporción de heridas intactas.

La figura 9 es una gráfica que representa que el tratamiento con el antagonista de NGF de molécula

pequeña, K252a, redujo significativamente ($p < 0,005$) el dolor en reposo tras la cirugía, cuando se evaluó a las tres horas ("3H-P-tmt") tras el tratamiento con K252a. "1H-P-tmt" se refiere a una hora tras el tratamiento con K252a.

La figura 10 es una gráfica que compara el tratamiento con anticuerpo anti-NGF, 911, y el tratamiento con un anticuerpo control de isotipo afin. Los animales tratados con 1 mg/kg de anticuerpo anti-NGF (911) mostraron una reducción significativa del dolor en reposo ($p < 0,05$). Por el contrario, los animales tratados con 1 mg/kg de un anticuerpo control de isotipo afin frente a la proteína amnésica de *Drosophila* presentaron niveles normales del dolor en reposo. Este experimento demostró que el efecto analgésico del anticuerpo anti-NGF era específico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento de que puede usarse la administración *in vivo* de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de NGF tal como anticuerpo monoclonal anti-NGF para prevenir y/o tratar el dolor postquirúrgico. El dolor postquirúrgico se ha tratado anteriormente con altas dosis de analgésicos opioideos. Estos agentes provocan efectos secundarios no deseables tales como motilidad gástrica reducida, sedación, depresión respiratoria y cólico renal. Otros agentes contra el dolor, tales como AINE, han sido relativamente insatisfactorios para tratar este tipo de dolor. Además, se sabe que algunos AINE inhiben la cicatrización de heridas.

La invención caracteriza la prevención o el tratamiento de dolor postquirúrgico en un individuo (incluyendo un mamífero, tanto humano como no humano) mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF, por ejemplo un anticuerpo monoclonal anti-NGF humano (anti-hNGF).

En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para mejorar, retrasar el desarrollo de y/o prevenir la evolución de dolor postquirúrgico que comprenden administrar una cantidad eficaz de un antagonista de NGF a un individuo.

En algunas realizaciones, el dolor en reposo se suprime, mejora y/o previene, y en algunas realizaciones, el dolor inducido mecánicamente (tal como el dolor que resulta del movimiento u otra estimulación mecánica o táctil) se suprime, mejora y/o previene. En alguna realización, el dolor inducido térmicamente se suprime, mejora y/o previene. En algunas realizaciones, el dolor inducido mecánicamente se suprime, mejora y/o previene mediante la administración de un anticuerpo anti-NGF. En algunas realizaciones, el dolor en reposo se suprime, mejora y/o previene mediante la administración de un anticuerpo anti-NGF. En alguna realización, el dolor inducido térmicamente se suprime, mejora y/o previene mediante la administración de un anticuerpo anti-NGF. En algunas realizaciones, la alodinia se suprime, mejora y/o previene, y en algunas realizaciones, la hiperalgesia se suprime, mejora y/o previene. Todavía en realizaciones adicionales, la alodinia y/o hiperalgesia es de naturaleza térmica o mecánica (táctil), o dolor en reposo. En algunas realizaciones, el dolor es dolor crónico. En otras realizaciones, el dolor está en, próximo y/o cerca de uno o más sitios de incisión, herida o traumatismo.

La invención también caracteriza composiciones y kits para tratar el dolor postquirúrgico que comprenden un anticuerpo anti-NGF, por ejemplo un anticuerpo monoclonal anti-NGF, para su uso en cualquiera de los procedimientos proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF puede inhibir de manera eficaz la unión de NGF a su(s) receptor(es) TrkA y/o p75 y/o puede inhibir de manera eficaz que NGF active a su(s) receptor(es) TrkA y/o p75.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes) microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican de manera completa en la bibliografía, tal como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook, *et al.*, 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.*, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway y P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definiciones

Un "anticuerpo" (usado de manera intercambiable en la forma plural) es una molécula de inmunoglobulina que puede unirse específicamente a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido,

etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, el término engloba no sólo anticuerpos monoclonales o policlonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tal como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadena sencilla (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM (o subclases de los mismos), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulina puede asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Se conocen bien las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogéneos estando compuesto el anticuerpo por aminoácidos (que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural) que están implicados en la unión selectiva de un antígeno. Una población de anticuerpos monoclonales es altamente específica, que se dirige frente a un único sitio antigénico. La expresión "anticuerpo monoclonal" engloba no sólo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa sino también fragmentos de los mismos (tal como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadena sencilla (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la capacidad de unión a un antígeno y la especificidad requerida. No se pretende que se limite con respecto a la fuente del anticuerpo o la manera en la que se realiza (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fago, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.).

Los anticuerpos "humanizados" se refieren a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana y la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender o bien dominios variables completos fusionados en dominios constantes o bien sólo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) injertadas en regiones de entramado apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo natural o modificados mediante una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados para parecerse de la manera más próxima a la inmunoglobulina humana. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene todas las seis CDR de los anticuerpos de ratón). Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que están modificadas con respecto al anticuerpo original. En algunos casos, los residuos de la región de entramado (FR) u otros residuos de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "factor de crecimiento nervioso" y "NGF" se refiere al factor de crecimiento nervioso y variantes del mismo que retienen al menos parte de la actividad de NGF. Tal como se usa en el presente documento, NGF incluye todas las especies de mamífero de NGF de secuencia nativa, incluyendo ser humano, canino, felino, equino o bovino.

El "receptor de NGF" se refiere a un polipéptido que se une mediante o está activado mediante NGF. Los receptores de NGF incluyen el receptor TrkA y el receptor p75 de cualquier especie de mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, ser humano, canino, felino, equino, primate o bovino.

Un "antagonista de NGF" se refiere a cualquier molécula que bloquea, suprime o reduce (incluyendo significativamente) la actividad biológica de NGF, incluyendo rutas secuencia abajo medidas por la señalización de NGF, tal como unión a receptor y/o provocación de una respuesta celular a NGF. El término "antagonista" no implica un mecanismo específico de cualquier acción biológica, y se considera que engloba e incluye expresamente todas las posibles interacciones farmacológicas, fisiológicas y bioquímicas con NGF ya sean directas o indirectas, o si interacciona con NGF, su receptor, o a través de otro mecanismo, y sus consecuencias que pueden lograrse mediante una variedad de composiciones diferentes, y químicamente divergentes. Los antagonistas de NGF a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-NGF, una molécula antisentido dirigida frente a un NGF (incluyendo una molécula antisentido dirigida frente a un ácido nucleico que codifica para NGF), un compuesto inhibidor de NGF, un análogo estructura de NGF, una mutación negativa dominante de un receptor TrkA que se une a un NGF, una inmuno adhesina de TrkA, un anticuerpo anti-TrkA, un anticuerpo anti-p75 y un inhibidor de cinasa. Para el fin de la presente invención, se entenderá explícitamente que el término "antagonista" engloba todos los términos, títulos, características y estados funcionales identificados anteriormente mediante los cuales el propio NGF, una actividad biológica de NGF (incluyendo pero no limitado a su capacidad para mediar cualquier aspecto de dolor postquirúrgico), o las consecuencias de la actividad biológica, están sustancialmente anulados, reducidos o

neutralizados en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un antagonista de NGF (por ejemplo, un anticuerpo) se une a (interacciona físicamente con) NGF, se une a un receptor de NGF (tal como receptor *trkA* y/o receptor *p75*), reduce (impide y/o bloquea) la señalización de receptor de NGF secuencia abajo, y/o inhibe (reduce) la síntesis, producción o liberación de NGF. En otras realizaciones, un antagonista de NGF se une a NGF y evita la dimerización del receptor *TrkA* y/o la autofosforilación de *TrkA*. En otras realizaciones, un antagonista de NGF inhibe o reduce la síntesis y/o producción (liberación) de NGF. Se proporcionan en el presente documento ejemplos de tipos de antagonistas de NGF.

Tal como se usa en el presente documento, un “anticuerpo anti-NGF” se refiere a un anticuerpo que puede unirse a NGF e inhibe la actividad biológica de NGF y/o ruta(s) secuencia abajo mediada(s) mediante la señalización de NGF.

Una “inmunoadhesina de *TrkA*” se refiere a una molécula quimérica soluble que comprende un fragmento de un receptor *TrkA*, por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor *TrkA* y una secuencia de inmunoglobulina, que conserva la especificidad de unión del receptor *TrkA*.

La “actividad biológica” de NGF se refiere generalmente a la capacidad de unirse a receptores de NGF y/o de activar las rutas de señalización del receptor de NGF. Sin limitación, una actividad biológica incluye una cualquiera o más de las siguientes: la capacidad de unirse a un receptor de NGF (tal como *p75* y/o *TrkA*); la capacidad de promover la autofosforilación y/o dimerización del receptor *TrkA*; la capacidad de activar una ruta de señalización del receptor de NGF; la capacidad de promover la diferenciación, proliferación, supervivencia, crecimiento celular y otros cambios en la fisiología celular, incluyendo (en el caso de neuronas, que incluye neurona periférica y central) cambio en la morfología neuronal, sinaptogénesis, función sináptica, liberación y regeneración tras daño de neurotransmisores y/o neuropéptidos; y la capacidad de mediar el dolor postquirúrgico.

El término “epítipo” se usa para referirse a sitios de unión para anticuerpos (monoclonales o policlonales) en antígenos de proteína.

Tal como se usa en el presente documento, “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados clínicos deseados o beneficiosos. Para los fines de este invención, los resultados clínicos deseados o beneficiosos incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: mejora de cualquier aspecto del dolor incluyendo la disminución de la gravedad, alivio de uno o más síntomas asociados con dolor postquirúrgico incluyendo cualquier aspecto de dolor postquirúrgico (tal como dolor en reposo y/o dolor inducido mecánicamente, acortando la duración del dolor, y/o la reducción de la sensación de o sensibilidad al dolor).

Una “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para efectuar resultados clínicos deseados o beneficiosos incluyendo alivio o reducción del dolor. Para los fines de esta invención, una cantidad eficaz de un antagonista de NGF es una cantidad suficiente para tratar, mejorar, reducir la intensidad de o evitar el dolor postquirúrgico. En algunas realizaciones, la “cantidad eficaz” puede reducir el dolor en estado de reposo (dolor en reposo) o dolor inducido mecánicamente (incluyendo dolor tras movimiento), o ambos, y puede administrarse antes, durante y/o tras una incisión, un corte, un desgarro o una lesión. En alguna realización, la “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo de dolor postquirúrgico.

La “reducción de incidencia” de dolor significa cualquier reducción de la gravedad (que puede incluir reducción necesaria de y/o cantidad de (por ejemplo, exposición a) otros fármacos y/o terapias generalmente usadas para estos estados, incluyendo, por ejemplo, opiáceos), duración y/o frecuencia (incluyendo, por ejemplo, retraso o aumento del tiempo hasta el dolor postquirúrgico en un individuo). Tal como los expertos en la técnica entienden, los individuos pueden variar en cuanto a sus respuestas al tratamiento, y, como tal por ejemplo, un “procedimiento de reducción de la incidencia de dolor postquirúrgico en un individuo” refleja la administración del antagonista de NGF descrito en el presente documento basándose en una expectativa razonable de que tal administración puede provocar probablemente una reducción de la incidencia de este tipo es ese individuo particular.

La “mejora” del dolor postquirúrgico o uno o más síntomas del dolor postquirúrgico significa una disminución o mejora de uno o más síntomas de un dolor postquirúrgico cuando se compara con la no administración de un antagonista de NGF. La “mejora” también incluye el acortamiento o reducción de la duración de un síntoma.

La “paliación” del dolor postquirúrgico o uno o más síntomas de un dolor postquirúrgico significa la disminución del grado de una o más manifestaciones clínicas no deseables del dolor postquirúrgico en un individuo o población de individuos tratados con un antagonista de NGF según la invención.

Tal como se usa en el presente documento, el “retraso” del desarrollo del dolor postquirúrgico significa aplazar, impedir, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer la evolución del dolor postquirúrgico. Este retraso puede ser de duraciones de tiempo variables dependiendo de la historia de la enfermedad y/o los individuos que están tratándose. Tal como es evidente para un experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, englobar la prevención, en la que el individuo no desarrolla dolor postquirúrgico. Un procedimiento que “retrasa” el desarrollo del síntoma es un procedimiento que reduce la probabilidad de desarrollar el síntoma en un marco de tiempo dado y/o reduce el grado de los síntomas en un marco de tiempo dado, cuando se compara con el no uso del procedimiento. Tales comparaciones se basan normalmente en estudios clínicos, usando un número de sujetos estadísticamente significativo.

El “desarrollo” o la “evolución” de dolor postquirúrgico significa manifestaciones iniciales y/o evolución resultante del trastorno. El desarrollo de dolor postquirúrgico puede detectarse y evaluarse usando técnicas clínicas convencionales que se conocen bien en la técnica. Sin embargo, el desarrollo también se refiere a la evolución que puede no detectarse. Para el fin de esta invención, el desarrollo o la evolución se refiere al curso biológico de los síntomas. El “desarrollo” incluye la existencia, recurrencia y aparición. Tal como se usa en el presente documento “aparición” o “existencia” de dolor postquirúrgico incluye la aparición inicial y/o recurrencia.

Un “individuo” es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja, animales deportivos, animales domésticos, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

El “dolor postquirúrgico” (denominado de manera intercambiable “dolor postraumático” o “postincisional”) se refiere a dolor que surge o resulta de un traumatismo externo tal como un corte, una punción, una incisión, un desgarro o una herida en el tejido de un individuo (incluyendo el que surge de todos los procedimientos quirúrgicos, ya sean invasivos o no invasivos). Tal como se usa en el presente documento, el “dolor postquirúrgico” no incluye el dolor que se produce sin un traumatismo físico externo. En algunas realizaciones, el dolor postquirúrgico es interno o externo, y la herida, el corte, el traumatismo, el desgarro o la incisión puede producirse de manera accidental (tal como con una herida traumática) o de manera deliberada (tal como con una incisión quirúrgica). Tal como se usa en el presente documento, el “dolor” incluye la nocicepción y la sensación del dolor, y el dolor puede evaluarse de manera objetiva y subjetiva, usando intensidades de dolor y otros procedimientos bien conocidos en la técnica. El dolor postquirúrgico, tal como se usa en el presente documento, incluye alodinia (es decir, un aumento de respuesta a un estímulo no nocivo) e hiperalgesia (es decir, un aumento de respuesta a un estímulo normalmente nocivo o desagradable), que a su vez puede ser de naturaleza térmica o mecánica (táctil). En algunas realizaciones, el dolor se caracteriza por la sensibilidad térmica, sensibilidad mecánica y/o dolor en reposo. En algunas realizaciones, el dolor postquirúrgico comprende dolor inducido mecánicamente o dolor en reposo. En otras realizaciones, el dolor postquirúrgico comprende dolor en reposo. El dolor puede ser dolor primario o secundario, tal como se conoce bien en la técnica.

El “dolor en reposo” se refiere a dolor que se produce incluso mientras el individuo está en reposo a diferencia de, por ejemplo, el dolor que se produce cuando el individuo se mueve o está sometido a otros estímulos mecánicos (por ejemplo, codazos o pinchazos).

El “dolor inducido mecánicamente” (denominado de manera intercambiable dolor mecanosensorial) se refiere a dolor inducido mediante un estímulo mecánico, tal como la aplicación de peso en una superficie, estímulo táctil y estimulación provocada o asociada con el movimiento (incluyendo tos, desplazamiento del peso, etc.).

Se “potencia” la recuperación de la cirugía, traumatismo o herida cuando se mejora un aspecto de la cirugía, traumatismo o herida (en comparación con la recuperación de la cirugía, traumatismo o herida sin la administración de un antagonista de NGF). Por ejemplo, la presencia y/o intensidad de efectos secundarios no deseados (tales como efectos secundarios asociados con el uso de calmantes convencionales (por ejemplo opiáceos)) puede reducirse y/o eliminarse en presencia de un antagonista de NGF con respecto a la presencia y/o intensidad de tales efectos secundarios en ausencia de un antagonista de NGF. Este potenciamiento está indicado mediante la administración de un antagonista de NGF y no significa sugerir que una comparación de este tipo (administración de un antagonista de NGF frente a no administración) tenga que realizarse y probarse con respecto a ningún individuo dado.

Procedimiento de la invención

Con respecto a todos los procedimientos descritos en el presente documento, la referencia a un anticuerpo anti-NGF también incluye composiciones que comprenden uno o más de estos agentes. Estas composiciones pueden comprender además excipientes adecuados, tales como excipientes (vehículos) farmacéuticamente aceptables incluyendo tampones, que se conocen bien en la técnica. La presente invención puede usarse sola o en combinación con otros procedimientos de tratamiento convencionales.

Procedimientos para prevenir o tratar dolor postquirúrgico

La presente invención es útil para tratar, retrasar el desarrollo de y/o prevenir el dolor postquirúrgico en individuos que incluyen todos los mamíferos, tanto humanos como no humanos. Además, la presente invención es útil en individuos que tienen una herida incisional en el tejido ya sea un corte, una punción o un desgarro, ya sea interna o externa. Una herida incisional de este tipo puede producirse de manera accidental tal como el caso de herida traumática o de manera deliberada tal como el caso de cirugía.

Por consiguiente, en un aspecto la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF para su uso en el tratamiento de dolor postquirúrgico en un individuo. En algunas realizaciones, el dolor postquirúrgico comprende uno o más de: alodinia, hiperalgesia, dolor inducido mecánicamente, dolor inducido térmicamente, dolor inducido mecánicamente o dolor en reposo. En algunas realizaciones, el dolor postquirúrgico comprende dolor inducido mecánicamente y/o dolor en reposo. Se ha observado, por ejemplo, que anticuerpos anti-NGF alivian ambos de estos aspectos. En otras realizaciones, el dolor postquirúrgico comprende dolor en reposo. El dolor puede ser dolor primario y/o secundario. En otras realizaciones, la alodinia se suprime, mejora y/o previene, y en algunas

realizaciones, la hiperalgesia se suprime, mejora y/o previene. Todavía en realizaciones adicionales, la alodinia y/o hiperalgesia es de naturaleza térmica o mecánica (táctil) (o ambas), o dolor en reposo. En algunas realizaciones, el dolor es dolor crónico. En otras realizaciones, el dolor está en, próximo y/o cerca de uno o más sitio(s) de incisión, herida o traumatismo.

5 En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpo anti-NGF para su uso para prevenir, mejorar y/o prevenir el desarrollo o evolución del dolor postquirúrgico.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF, se administra antes de la cirugía (en alguna realización, antes de la actividad que probablemente de cómo resultado una herida y/o un traumatismo externo). Por ejemplo, el anticuerpo anti-NGF puede administrarse 30 minutos, una hora, 5 horas, 10 horas, 15 horas, 24 horas o incluso más, tal como 1 día, varios días, o incluso una semana, dos semanas, tres semanas, o más antes de la actividad con un riesgo de traumatismo, herida o incisión, o antes de una intervención quirúrgica (en alguna realización, que probablemente da como resultado un traumatismo, una herida o incisión). En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se administra durante y/o tras la cirugía o actividad que probablemente da como resultado un traumatismo o una herida externos. En una realización, el anticuerpo anti-NGF se administra 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 30 horas, 36 horas, o más, tras cirugía, herida o traumatismo.

15 En otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para aumentar el umbral de dolor. Tal como se usa en el presente documento, "aumentar el umbral de dolor" se refiere a una reducción, disminución y/o minimización del dolor asociado con la cirugía, incisión, traumatismo o herida (incluyendo una reducción, disminución y/o minimización de percepción subjetiva del dolor).

20 Aún en otro aspecto, la invención proporciona procedimientos para potenciar la recuperación de la cirugía (así como también potenciar la recuperación de herida, lesión traumática y/o incisión).

25 Se aprecia que aunque se hace referencia generalmente en el presente documento al tratamiento o prevención del dolor postquirúrgico, el anticuerpo anti-NGF puede administrarse antes de un acontecimiento o estado(s) con un aumento de riesgo de traumatismo (tal como un impacto), lesión o herida externos. Tal como un experto en la técnica entiende, un acontecimiento o estado con un aumento de riesgo de traumatismo, lesión o herida externos engloba actividades deportivas, combate y/o vocaciones peligrosas.

30 El diagnóstico o la evaluación del dolor está bien establecido en la técnica. Puede realizarse la evaluación basándose en la medida objetivo, tal como la observación del comportamiento tal como una reacción a estímulos, expresiones faciales y similares. La evaluación puede estar basada también en mediciones subjetivas, tal como la caracterización del dolor del paciente usando diversas escalas de dolor. Véase, por ejemplo, Katz *et al*, Surg Clin North Am. (1999) 79 (2):231-52; Caraceni *et al*. J Pain Symptom Manage (2002) 23(3):239-55.

35 También puede caracterizarse el alivio del dolor por el transcurso temporal del alivio. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el alivio del dolor se observa de manera subjetiva u objetiva tras 1, 2, o algunas horas (y en algunas realizaciones, máximos en aproximadamente 12-18 horas). En otra realización, el alivio del dolor se observa de manera subjetiva u objetiva en 24, 36, 48, 60, 72 o más horas tras la cirugía (o acontecimiento asociado con herida o traumatismo).

Antagonistas de NGF

40 La invención utiliza un anticuerpo anti-NGF. Un antagonista de NGF se refiere a cualquier molécula que bloquea, suprime o reduce (incluyendo significativamente) la actividad biológica de NGF, incluyendo rutas secuencia abajo mediadas mediante la señalización de NGF, tal como unión a receptor y/o provocación de una respuesta celular a NGF. El término "antagonista" no implica un mecanismo específico de cualquier acción biológica, y se considera que incluye y engloba expresamente todas las posibles interacciones farmacológica, fisiológica y bioquímica con NGF y sus consecuencias que pueden lograrse mediante una variedad de composiciones diferentes y químicamente divergentes. Se describen en el presente documento antagonistas de NGF distintos de un anticuerpo anti-NGF para fines comparativos e incluyen una molécula antisentido dirigida frente a NGF (incluyendo una molécula antisentido dirigida frente a un ácido nucleico que codifica para NGF), una molécula antisentido dirigida frente a un receptor de NGF (tal como receptor TrkA y/o receptor p75) (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica para TrkA y/o p75), un compuesto inhibidor de NGF, un análogo estructural de NGF, una mutación negativa dominante de un receptor TrkA que se une a un NGF, una inmunoadhesina de TrkA, un anticuerpo anti-TrkA, un anticuerpo anti-p75, y un inhibidor de cinasa. Para el fin de la presente invención, se entenderá de manera explícita que el término "antagonista" engloba todos los términos, títulos y características y estados funcionales identificados anteriormente, mediante los cuales el propio NGF, una actividad biológica de NGF (incluyendo pero sin limitarse a su capacidad para mediar cualquier aspecto del dolor postquirúrgico), o las consecuencias de la actividad biológica, se anulan, se reducen o neutralizan sustancialmente en cualquier grado significativo. En alguna realización, el anticuerpo anti-NGF se une a NGF (tal como hNGF) y no se une de manera significativa a neurotrofinas relacionadas, tales como NT-3, NT4/5 y/o BDNF. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF no está asociado con una respuesta inmunitaria adversa. Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF está humanizado (tal como anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es anticuerpo E3 (tal como se describe en el presente documento). En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende uno o más CDR(s) de anticuerpo E3 (tal como uno, dos, tres, cuatro, cinco o, en

algunas realizaciones, todos las seis CDR de E3). En otras realizaciones, el anticuerpo es humano. Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada mostrada en la tabla 1 (SEQ ID NO:1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera mostrada en la tabla 2 (SEQ ID NO:2). Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no provoca la lisis mediada por complementos, o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). En otras realizaciones, la región constante está modificada tal como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; publicación PCT n.º WO9958572 ; y/o solicitud de patente del Reino Unido n.º 9809951.8.

Anticuerpos anti-NGF

10 Un anticuerpo anti-NGF debería mostrar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unirse a NGF; (b) inhibir la actividad biológica de NGF o rutas secuencia abajo mediadas mediante la función de señalización de NGF; (c) prevenir, mejorar o tratar cualquier aspecto del dolor postquirúrgico; (d) bloquear o reducir la activación del receptor de NGF (incluyendo la autofosforilación y/o dimerización del receptor TrkA); (e) aumentar el aclaramiento de NGF; (f) inhibir (reducir) la síntesis, producción o liberación de NGF; (g) potenciar la recuperación a partir de cirugía, herida o traumatismo.

15 Se conocen en la técnica anticuerpos anti-NGF, véase por ejemplo, las publicaciones PCT n.ºs WO 01/78698, WO 01/64247, las patentes estadounidenses n.ºs 5.844.092, 5.877.016 y 6.153.189; Hongo *et al.*, Hybridoma, 19:215-227 (2000); Cell. Molec. Biol. 13: 559-568 (1993); n.ºs de registro de GenBank U39608, U39609, L17078 o L17077.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es un anticuerpo monoclonal anti-NGF de ratón humanizado denominado "E3", que comprende la región constante de IgG2a de cadena pesada que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2a de tipo natural; véase Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); la región constante kappa de cadena ligera humana; y las regiones variables de cadena ligera y pesada humanas mostradas en las tablas 1 y 2.

25 **Tabla 1:** Región variable de cadena pesada

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWRQPPGKGLEWIGIHWGDGTTDYN SAVKSRVTISK-DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFYFDYWGQGLTVTS (SEQ ID NO:1).

Tabla 2: Región variable de cadena ligera

30 DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCRASQSISSNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS-GTDFFTTISLQPEDATYYCQEQEHT LPYTFGGQGTKLEIKRT (SEQ ID NO:2).

Los siguientes polinucleótidos que codifican para la región variable de cadena pesada o la región variable de cadena ligera se depositaron en el ATCC el 8 de enero de 2003:

| Material | | n.º de registro ATCC | Fecha de depósito |
|----------------------|---------------------------------|----------------------|--------------------|
| Vector Eb.911.3E | Región V de cadena ligera de E3 | PTA-4893 | 8 de enero de 2003 |
| Vector Eb.pur.911.3E | Región V de cadena ligera de E3 | PTA-4894 | 8 de enero de 2003 |
| Vector Db.911.3E | Región V de cadena pesada de E3 | PTA-4895 | 8 de enero de 2003 |

35 El vector Eb.911.3E es un polinucleótido que codifica para la región variable de cadena ligera mostrada en la tabla 2; el vector Eb.pur.911.3E es un polinucleótido que codifica para la región variable de cadena ligera mostrada en la tabla 2 y el vector Db.911.3E es un polinucleótido que codifica para la región variable de cadena pesada mostrada en la tabla 1.

40 En otra realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una o más CDR(s) de anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco o, en algunas realizaciones, todas las seis CDR de E3). La determinación de las regiones CDR está dentro de los conocimientos de la técnica.

45 Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden englobar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, cadena sencilla (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento a antígeno de la

5 especificidad requerida, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos, y anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos, o cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos humanizados o quiméricos). Para los fines de esta invención, el anticuerpo reacciona con NGF de manera que inhibe el NGF y/o rutas secuencia abajo mediadas mediante la función de señalización de NGF. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano que reconoce uno o más epítomos en NGF humano. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón o rata que reconoce uno o más epítomos en NGF humano. En otra realización, el anticuerpo reconoce uno o más epítomos en un NGF seleccionado del grupo que constituido por: primate, canino, felino, equino y bovino. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no provoca la lisis mediada por complementos, o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). La actividad de ADCC puede evaluarse usando procedimientos dados a conocer en la patente estadounidense n.º 5.500.362. En otras realizaciones, la región constante está modificada tal como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624; publicación PCT n.º WO9958572 ; y/o solicitud de patente del Reino Unido n.º 9809951.8.

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

35 Un modo de determinar la afinidad de unión de anticuerpos a NGF es mediante la medición de la afinidad de unión del fragmento Fab monofuncional del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, puede escindirse un anticuerpo (por ejemplo, IgG) con papaína o expresarse de manera recombinante. La afinidad de un fragmento Fab anti-NGF de un anticuerpo puede determinarse mediante resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial (SPR) BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ). Pueden activarse chips CM5 con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del fabricante. Puede diluirse NGF humano (o cualquier otro NGF) en acetato de sodio 10 mM pH 4,0 e inyectarse sobre el chip activado a una concentración de 0,005 mg/ml. Con el uso de tiempo de flujo variable por los canales del chip individuales, pueden lograrse dos intervalos de densidad de antígeno: 100-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados y 500-600 UR para ensayos de selección. El chip puede bloquearse con etanolamina. Los estudios de regeneración han mostrado que una mezcla de tampón de elución de Pierce (producto n.º 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) y NaCl 4 M (2:1) elimina de manera eficaz el Fab unido manteniendo la actividad de hNGF en el chip durante más de 200 inyecciones. Se usa tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, tensioactivo P29 al 0,005%) como tampón de corrida para los ensayos de BIAcore. Se inyectan diluciones en serie (0,1-10x KD estimada) de muestras de Fab purificada durante 1 min. a 100 l/min. y se dejan tiempos de disociación de hasta 2 h. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan mediante ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE usando un Fab de concentración conocida (tal como se determina mediante análisis de aminoácidos) como patrón. Se obtienen tasas de asociación (k_{on}) y tasas de disociación (k_{off}) cinéticas simultáneamente ajustando los datos a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Se calculan valores de constante de disociación (K_D) de equilibrio como k_{off}/k_{on} . Este protocolo es adecuado para su uso para determinar la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier NGF, incluyendo NGF humano, NGF de otro vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero) (tal como NGF de ratón, NGF de rata, NGF de primate), así como también para su uso con otras neurotrofinas, tales como las neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 y/o BDNF.

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

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

En un aspecto, pueden prepararse anticuerpos (por ejemplo, humanos, humanizados, de ratón, quiméricos), que pueden inhibir el NGF, usando inmunógenos que expresan la secuencia parcial o de longitud completa de NGF. En otro aspecto, puede usarse un inmunógeno que comprende una célula que sobreexpresa el NGF. Otro ejemplo de un inmunógeno que puede usarse es la proteína de NGF que contiene NGF de longitud completa o una parte de la proteína de NGF.

Los anticuerpos anti-NGF pueden prepararse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. La vía y el programa de inmunización del animal huésped concuerdan generalmente con técnicas establecidas y convencionales para la estimulación y producción de anticuerpos, tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Se conocen en la técnica técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón y se describen en el presente documento.

Se contempla que cualquier sujeto mamífero incluyendo seres humanos o células que producen anticuerpos del mismo puede manipularse para servir como base de producción de líneas de células de hibridoma de mamífero, incluyendo ser humano. Normalmente, el animal huésped se inocula por vía intraperitoneal, por vía intramuscular, por vía oral, por vía subcutánea, por vía intraplantar y/o por vía intradérmica con una cantidad de inmunógeno, incluyendo tal como se describe en el presente documento.

Pueden prepararse hibridomas a partir de los linfocitos y células de mieloma inmortalizadas usando la técnica general de hibridación de células somáticas de Kohler, B. y Milstein, C. (1975) Nature 256:495-497 o como modificada por Buck, D. W., *et al.*, In Vitro, 18:377-381 (1982). Pueden usarse en la hibridación líneas de mieloma disponibles, incluyendo pero sin limitarse a X63-Ag8.653 y las del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., EE.UU.. Generalmente, la técnica implica fusionar células de mieloma y células linfoides usando un fusógeno tal como polietilenglicol, o mediante medios eléctricos bien conocidos para los expertos en la técnica. Tras la fusión, se separa el medio de fusión de las células y se hacen crecer en un medio de crecimiento selectivo, tal como medio de hipoxantina-aminopterin-timidina (HAT), para eliminar células madre no hibridadas. Cualquiera de los medios descritos en el presente documento, complementados con o sin suero, pueden usarse para cultivar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, pueden usarse células B inmortalizadas de VEB para producir los anticuerpos monoclonales anti-NGF de la presente invención. Los hibridomas se expanden y se subclonan, si se desea, y se someten a ensayo los sobrenadantes para determinar la actividad anti-inmunógeno mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoanálisis, inmunoensayo enzimático o inmunoensayo de fluorescencia). Los hibridomas que pueden usarse como fuente de anticuerpos engloban todos los derivados, células de progenie de los hibridomas madre que producen anticuerpos monoclonales específicos para NGF, o una parte de los mismos. Los hibridomas que producen tales anticuerpos pueden hacerse crecer *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de los medios de cultivo o fluidos corporales, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como precipitación en sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si está presente, puede eliminarse, por ejemplo, haciendo correr la preparación sobre adsorbentes preparado del inmunógeno unido a una fase sólida y separando por elución o liberación los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con un NGF humano, o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugada a una proteína que es inmunógena en la especie que va a inmunizarse, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo éster de maleimidobenzilsulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂ o R1N=C=NR, en el que R y R1 son grupos alquílicos diferentes, puede proporcionar una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

Si se desea, puede secuenciarse el anticuerpo anti-NGF (monoclonal o policlonal) de interés y entonces

puede clonarse la secuencia de polinucleótidos en un vector para la expresión o propagación. La secuencia que codifica para el anticuerpo de interés puede mantenerse en el vector en una célula huésped y entonces puede expandirse la célula huésped y congelarse para su futuro uso. En una alternativa, la secuencia de polinucleótidos puede usarse para la manipulación genética para "humanizar" el anticuerpo o para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante puede modificarse mediante ingeniería genética para parecerse más a regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmunitaria si se usa el anticuerpo en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia de anticuerpo para obtener mayor afinidad al NGF y mayor eficacia para inhibir el NGF. Será evidente para un experto en la técnica que puede realizarse uno o más cambios de polinucleótidos para el anticuerpo anti-NGF y mantener todavía su capacidad de unión a NGF.

Existen cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de los dominios variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región de entramado de anticuerpo usar durante el procedimiento de humanización (3) las técnicas/metodologías de humanización real y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidense n.ºs 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

Se han descrito varias moléculas de anticuerpo "humanizado" que comprenden un sitio de unión a antígeno derivadas de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedores o roedores modificadas y sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR) asociadas fusionadas a dominios constantes. Véase, por ejemplo, Winter *et al.* Nature 349:293-299 (1991), Lobuglio *et al.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:4220-4224 (1989), Shaw *et al.* J Immunol. 138:4534-4538 (1987) y Brown *et al.* Cancer Res. 47:3577-3583 (1987). Otras referencias describen las CDR de roedores injertadas en una región de entramado (FR) de soporte humana antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado. Véase, por ejemplo, Riechmann *et al.* Nature 332:323-327 (1988), Verhocy *et al.* Science 239:1534-1536 (1988) y Jones *et al.* Nature 321:522-525 (1986). Otra referencia describe las CDR de roedores soportadas mediante regiones de entramado de roedores cubiertas de manera recombinante. Véase, por ejemplo, la publicación de patente europea n.º 0519596. Estas moléculas "humanizadas" se diseñan para minimizar la respuesta inmunológica no deseada con respecto a moléculas de anticuerpo de roedor anti-humano que limita la duración y eficacia de aplicaciones terapéuticas de esos restos en receptores humanos. Por ejemplo, la región constante de anticuerpo puede modificarse mediante ingeniería genética de manera que es inmunológicamente inerte (por ejemplo, no provoca la lisis por complementos). Véase, por ejemplo la publicación PCT n.º WO9958572, la solicitud de patente de Reino Unido n.º 9809951.8. Otros procedimientos de humanización de anticuerpos que también pueden utilizarse se dan a conocer por Daugherty *et al.*, Nucl. Acids Res. 19:2471-2476 (1991) y en las patentes estadounidenses n.ºs 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; y 6.350.861; y en la publicación PCT n.º WO 01/27160.

Aún en otra alternativa, pueden obtenerse anticuerpos completamente humanos usando ratones disponibles comercialmente que se han modificado mediante ingeniería genética para expresar proteínas de inmunoglobulinas humanas específicas. También pueden usarse animales transgénicos que se diseñan para producir una respuesta inmunitaria más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o más robusta para la generación de anticuerpos humanos o humanizados. Ejemplos de tal tecnología son Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

En una alternativa, pueden prepararse anticuerpos de manera recombinante y expresarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En otra alternativa, pueden prepararse anticuerpos de manera recombinante mediante la tecnología de presentación en fago. Véase, por ejemplo, patentes estadounidenses n.ºs 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150; y Winter *et al.*, Annu. Rev. Immunol. 12: 433-455 (1994). Alternativamente, la tecnología de presentación en fago (McCafferty *et al.*, Nature 348:552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios génicos de dominio variable (V) de inmunoglobulinas de donadores inmunizados. Según esta técnica, los genes de dominio V de anticuerpo se clonan en marco para dar un gen de proteína de la cubierta o bien minoritaria o bien mayoritaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Ya que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basándose en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica para el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fago puede realizarse en una variedad de formatos; para revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de gen V para la presentación en fago. Clackson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991) aislaron un alineamiento diverso anticuerpos anti-oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Un repertorio de genes V a partir de donadores humanos no inmunizados puede construirse y pueden aislarse anticuerpos frente a un alineamiento diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Mark *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith *et al.*, EMBO J. 12:725-734 (1993). En una respuesta inmunitaria natural, los genes de anticuerpo acumulan mutaciones a una alta tasa (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán afinidad superior, y las células B que presentan inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican preferentemente y se diferencian durante la exposición a antígeno posterior. Este proceso

natural puede imitarse empleando la técnica conocida como “transposición de cadena”. Marks, *et al.*, Bio/Technol. 10:779-783 (1992)). En este procedimiento, la afinidad de anticuerpos humanos “primarios” obtenida mediante presentación en fago puede mejorarse sustituyendo secuencialmente los genes de región V de cadena ligera y pesada con repertorios de variantes (repertorios) que se producen de manera natural de genes de dominio V obtenidos a partir de donadores no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades en el intervalo de pM-nM. Se ha descrito una estrategia para preparar repertorios de anticuerpos de fago muy grandes (también conocida como “la madre de todas las bibliotecas”) por Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res. 21:2265-2266 (1993). También puede usarse la transposición génica para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedores, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. Según este procedimiento, que también se denomina “generación de huella de epítipo”, el gen de dominio V de cadena ligera o pesada de anticuerpos de roedor obtenidos mediante la técnica de presentación en fago se sustituye por un repertorio de genes de dominio V humano, creando quimeras de roedor-humano. La selección en antígeno da como resultado el aislamiento de regiones variables humanas que pueden restablecer un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítipo dirige (genera la huella) la elección de la pareja. Cuando el procedimiento se repite con el fin de sustituir el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase la publicación PCT n.º WO 93/06213, publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la inmunización tradicional de anticuerpos de roedor mediante el injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen ningún residuo de CDR o entramado de origen roedor.

Es evidente que aunque la discusión anterior está relacionada con anticuerpos humanizados, los principios generales tratados pueden aplicarse para crear a medida anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primate, equinos y bovinos. Es evidente además que pueden combinarse uno o más aspectos de la humanización de un anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo, injerto de CDR, mutación de entramado y mutación de CDR.

Pueden prepararse anticuerpos de manera recombinante aislando en primer lugar los anticuerpos y células que producen anticuerpos a partir de animales huéspedes, obteniendo la secuencia génica, y usando la secuencia génica para expresar el anticuerpo de manera recombinante en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro procedimiento que puede emplearse es expresar la secuencia anticuerpo en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han dado a conocer procedimientos para expresar anticuerpos de manera recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters, *et al.* Vaccine 19:2756 (2001); Lonberg, N. y D. Huszar Int.Rev.Immunol 13:65 (1995); y Pollock, *et al.*, J Immunol Methods 231:147(1999). Se conocen en la técnica procedimientos para preparar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena sencilla, etc.

Las técnicas de clasificación por citometría de flujo e inmunoensayos tales como la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) también pueden emplearse para aislar anticuerpos que son específicos para NGF.

Los anticuerpos pueden unirse a muchos vehículos diferentes. Los vehículos pueden ser activos y/o inertes. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, vidrio, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser o bien soluble o bien insoluble para los fines de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para unir anticuerpos, o podrán determinar tales, usando la experimentación rutinaria.

El ADN que codifica para los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión (tales como vectores de expresión dados a conocer en la publicación PCT n.º WO 87/04462), que se transfieren entonces en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 87/04462. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante para dominios constantes de cadena ligera y pesada humanos en lugar de las secuencias de murino homólogas, Morrison *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851 (1984), o mediante la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no de inmunoglobulina. De esa manera se preparan anticuerpos “quiméricos” o “híbridos” que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-NGF en el presente documento.

Pueden caracterizarse anticuerpos anti-NGF usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento es identificar el epítipo al que se une, o “mapear epítipos”. Existen muchos procedimientos conocidos en la técnica para mapear y caracterizar la ubicación de epítipos en proteínas, incluyendo resolver la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos génicos y ensayos a base de péptidos sintéticos, tal como se describen, por ejemplo, en el capítulo 11 de Harlow y Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, puede usarse el mapeo de epítipos para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo anti-NGF. El mapeo de epítipos está disponible comercialmente a partir de diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelherweg 15, 8219 PH Lelystad, Los Países Bajos). El epítipo

puede ser un epítopo lineal, es decir, está contenido en un único tramo de aminoácidos, o un epítopo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que puede no estar contenido necesariamente en un único tramo. Pueden aislarse o sintetizarse (por ejemplo, de manera recombinante) péptidos de longitudes variables (por ejemplo, al menos de 4-6 aminoácidos de longitud) y usarse para ensayos de unión con un anticuerpo anti-NGF. En otro ejemplo, el epítopo al que se une el anticuerpo anti-NGF puede determinarse en una selección sistemática usando péptidos solapantes derivados de la secuencia de NGF y determinando la unión mediante el anticuerpo anti-NGF. Según los ensayos de expresión de fragmentos génicos, se fragmenta el marco de lectura abierto que codifica para NGF o bien aleatoriamente o bien mediante construcciones genéticas específicas y se determina la reactividad de los fragmentos expresados de NGF con el anticuerpo que va a someterse a prueba. Los fragmentos génicos puede producirse, por ejemplo, mediante PCR y entonces se transcriben y traducen para dar la proteína *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. Entonces se determina la unión del anticuerpo a los fragmentos NGF marcados de manera radiactiva mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. También pueden identificarse ciertos epítopos usando bibliotecas grandes de secuencias de péptidos aleatorios presentados en la superficie de partículas de fago (bibliotecas de fago). Alternativamente, una biblioteca definida de fragmentos de péptidos solapantes puede someterse a prueba para determinar la unión al anticuerpo de prueba en ensayos de unión simples. En un ejemplo adicional, pueden realizarse la mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de barrido mediante alanina para identificar residuos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión al epítopo. Por ejemplo, pueden realizarse experimentos de intercambio de dominios usando un NGF mutante en el que se han sustituido (intercambiado) diversos fragmentos del polipéptido NGF por secuencias de una proteína relacionada de manera próxima, pero antigénicamente distinta (tal como otro miembro de la familia de proteínas de neurotrofina). Mediante la evaluación de la unión del anticuerpo al NGF mutante, puede evaluarse la importancia de la unión del fragmento de NGF particular al anticuerpo.

Aún otro procedimiento que puede usarse para caracterizar un anticuerpo anti-NGF es usa ensayos de competición con otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno, es decir, diversos fragmentos en NGF, para determinar si el anticuerpo anti-NGF se une al mismo epítopo que otro anticuerpos. Los expertos en la técnica conocen bien los ensayos de competición. Los ejemplos de anticuerpos que pueden usarse en los ensayos de competición para la presente invención incluyen MAb 911, 912, 938, tal como se describe en Hongo, *et al.*, Hybridoma 19:215-227 (2000).

Otros antagonistas de NGF

Se describen en el presente documento antagonistas de NGF distintos de los anticuerpos anti-NGF para fines comparativos. Un antagonista de NGF puede ser al menos una molécula antisentido que puede bloquear o disminuir la expresión de un NGF funcional. Se conocen secuencias de nucleótidos del NGF y están fácilmente disponibles a partir de bases de datos disponibles públicas. Véase, por ejemplo, Borsani *et al.*, Nuc. Acids Res. 1990, 18, 4020; número de registro NM 002506; Ullrich *et al.*, Nature 303:821-825 (1983). Es rutinario preparar moléculas de oligonucleótidos antisentido que se unirán específicamente al ARNm de NGF sin reacciones cruzadas con otros polinucleótidos. Los sitios de selección como diana a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, el codón de iniciación, las regiones reguladoras en 5', la secuencia codificante y la región no traducida en 3'. Los oligonucleótidos pueden ser de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 15 a 50 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 18 a 25 nucleótidos de longitud, o más. Los oligonucleótidos pueden comprender modificaciones de estructura principal tales como, por ejemplo, uniones de fosforotioato, y modificaciones de azúcar 2'-O bien conocidas en la técnica. Las moléculas antisentido a modo de ejemplo incluyen las moléculas antisentido de NGF descritas en la publicación estadounidense n.º 20010046959; véase también <http://www.rna-tec.com/repair.htm>.

Un antagonista de NGF puede ser al menos una molécula antisentido que puede bloquear o disminuir la expresión de un receptor de NGF funcional (tal como TrkA y/o p75). Woolf *et al.*, J. Neurosci (2001) 21(3):1047-55; Taglialetela *et al.*, J Neurochem (1996) 66(5): 1826-35. Se conocen secuencias de nucleótidos de TrkA y p75 y están fácilmente disponibles a partir de bases de datos disponibles públicas.

Alternativamente, puede reducirse la expresión y/o la liberación de NGF y/o la expresión del receptor de NGF usando el silenciamiento génico, oligonucleótidos de morfolino, ARNi o ribozimas, procedimientos que se conocen bien en la técnica. Véase <http://www.ma-calester.edu/~montgomery/RNAi.html>; <http://pub32.ezboard.com/finorpholinosim19.showMessage?topicID=6.topic>; <http://www.highveld.com/ribozyme.html>.

Un antagonista de NGF puede ser al menos un compuesto inhibidor de NGF. Tal como se usa en el presente documento, "compuesto inhibidor de NGF" se refiere a un compuesto distinto de un anticuerpo anti-NGF que reduce, inhibe, neutraliza o elimina directa o indirectamente la actividad biológica de NGF. Un compuesto inhibidor de NGF debería mostrar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unirse a NGF; (b) inhibir la actividad biológica de NGF o rutas secuencia abajo mediadas mediante la función de señalización de NGF; (c) prevenir, mejorar o tratar cualquier aspecto del dolor postquirúrgico; (d) bloquear o reducir la activación del receptor de NGF (incluyendo autofosforilación y/o dimerización del receptor TrkA); (e) aumentar el aclaramiento de NGF; (f) inhibir (reducir) la síntesis, producción o liberación de NGF; (g) potenciar la recuperación a partir de cirugía. Los compuestos inhibidores de NGF a modo de ejemplo incluyen los inhibidores de NGF de molécula pequeña descritos en la publicación estadounidense n.º 20010046959; los compuestos que inhiben la unión de NGF a p75, tal como se describe en la publicación PCT n.º WO 00/69829; los compuestos que inhiben la unión de NGF a TrkA y/o p75, tal

como se describe en la publicación PCT n.º WO 98/17278. Los ejemplos adicionales de compuestos inhibidores de NGF incluyen los compuestos descritos en las publicaciones PCT n.ºs WO 02/17914 y WO 02/20479, y en las patentes estadounidenses n.ºs 5.342.942; 6.127.401; y 6.359.130. Los compuestos inhibidores de NGF a modo de ejemplo adicionales son compuestos que son inhibidores competitivos de NGF. Véase la patente estadounidense n.º 6.291.247. Además, un experto en la técnica puede preparar otros compuestos inhibidores de NGF de moléculas pequeñas.

Un compuesto inhibidor de NGF puede unirse a NGF. Los sitios de selección como diana (unión) a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, la parte del NGF que se une al receptor TrkA y/o receptor p75, y aquellas partes del NGF que son adyacentes a la región de unión al receptor y que son responsables, en parte, de la conformación tridimensional correcta de la parte de unión al receptor. En otra realización, un compuesto inhibidor de NGF se une a un receptor de NGF (tal como TrkA y/o p75) e inhibe una actividad biológica de NGF. Los sitios de selección como diana a modo de ejemplo incluyen aquellas partes de TrkA y/o p75 que se unen a NGF.

Una molécula pequeña puede tener un peso molecular de aproximadamente cualquiera de 100 dalton a 20.000 dalton, de 500 dalton a 15.000 dalton o de 1000 dalton a 10.000 dalton. Están comercialmente disponibles bibliotecas de moléculas pequeñas. Las moléculas pequeñas pueden administrarse usando cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo inhalación, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intratecal, por vía intraventricular, por vía oral, por vía enteral, por vía parenteral, por vía intranasal, o por vía dérmica. En general, cuando el antagonista de NGF según la invención es una molécula pequeña, se administrará a la tasa de 0,1 mg/kg a 300 mg/kg del peso del paciente dividido en de una a tres o más dosis. Para un paciente adulto de peso normal, pueden administrarse dosis que oscilan entre 1 mg y 5 g por dosis.

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

Un antagonista de NGF puede ser al menos un mutante negativo dominante del receptor TrkA y/o receptor p75. Un experto en la técnica puede preparar mutantes negativos dominantes de, por ejemplo, el receptor TrkA de manera que el receptor se unirá al NGF y, por tanto, actuará como un "sumidero" para capturar los NGF. Los mutantes negativos dominantes, sin embargo, no tendrán la bioactividad normal del receptor TrkA tras la unión a NGF. Los mutantes negativos dominantes a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los mutantes descritos en las siguientes referencias: Li *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95,10884; Eide *et al.*, J. Neurosci. 1996, 16, 3123; Liu *et al.*, J. Neurosci 1997, 17, 8749; Klein *et al.*, Cell 1990, 61, 647; Valenzuela *et al.*, Neuron 1993, 10, 963; Tsoulfas *et al.*, Neuron 1993, 10, 975; y Lamballe *et al.*, EMBO J. 1993, 12, 3083. Los mutantes negativos dominantes pueden administrarse en forma de proteína o en forma de un vector de expresión de manera que el mutante negativo dominante, por ejemplo, receptor TrkA mutante, se expresa *in vivo*. La proteína o el vector de expresión puede administrarse usando cualquier medio conocido en la técnica, tal como por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intratecal, por vía intraventricular, por vía oral, por vía enteral, por vía parenteral, por vía intranasal, por vía dérmica o mediante inhalación. Por ejemplo, la administración de vectores de expresión incluye administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración oral, administración cateterizada o por pistola genética, y administración tópica. Un experto en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471.

También puede usarse la administración seleccionada como diana de composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido antisentido, vector de expresión o polinucleótidos subgenómicos. Se describen técnicas de administración de ADN mediadas por receptor en, por ejemplo, Findeis *et al.*, Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou *et al.*, Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu *et al.*, J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu *et al.*, J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655; Wu *et al.*, J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Se administran composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para la administración local en un protocolo de terapia génica. También pueden usarse intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg, y de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN o más durante el protocolo de terapia génica. Los polipéptidos y polinucleótidos terapéuticos pueden administrarse usando vehículos de administración de genes. El vehículo de administración de genes puede ser de origen viral o no viral (véase generalmente, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy

(1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; y Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148). La expresión de tales secuencias codificantes puede inducirse usando potenciadores y/o promotores heterólogos o de mamífero endógenos. La expresión de la secuencia codificante puede ser o bien constitutiva o regulada.

5 Se conocen bien en la técnica vectores a base de virus para la administración de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada. Los vehículos a base de virus a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, retrovirus recombinantes (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT n.^{os} WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; las patentes estadounidenses n.^{os} 5.219.740 y 4.777.127; la patente GB n.^o 2.200.651; y la patente EP n.^o 0 345 242), vectores a base de alfavirus (por ejemplo, vectores de virus Sindbis, vectores de virus del bosque de Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del río Ross (ATCC VR- 373; ATCC VR-1246) y virus de encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), y virus adenoasociado (VAA) (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT n.^{os} WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También puede emplearse la administración de ADN unido a adenovirus inactivado tal como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

15 También pueden emplearse procedimiento y vehículos de administración no viral, incluyendo, pero sin limitarse a, ADN condensado policationico unido o no unido a adenovirus inactivado solo (véase, por ejemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); ADN unido a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985); células de vehículos de administración de célula eucariota (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.^o 5.814.482; las publicaciones PCT n.^{os} WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización o fusión de carga nucleica con membranas celulares. También puede emplearse ADN desnudo. Se describen procedimiento de introducción de ADN desnudo a modo de ejemplo en la publicación PCT n.^o WO 90/11092 y la patente estadounidense n.^o 5.580.859. Se describen liposomas que pueden actuar como vehículos de administración de genes en la patente estadounidense n.^o 5.422.120; las publicaciones PCT n.^{os} WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y la patente EP n.^o 0524968. Se describen enfoques adicionales en Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411, y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91:1581.

También es evidente que puede usarse un vector de expresión para la expresión directa de cualquiera de los antagonistas de NGF a base de proteínas descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpo anti-NGF, inmunoadhesina de TrkA, etc.). Por ejemplo, se conocen en la técnica otros fragmentos de receptor TrkA que pueden bloquear (bloqueo desde parcial hasta completo) NGF y/o una actividad biológica de NGF.

30 Un antagonista de NGF puede ser al menos una inmunoadhesina de TrkA. Las inmunoadhesinas de TrkA tal como se usan en el presente documento se refieren a moléculas quiméricas solubles que comprenden el dominio extracelular de un receptor TrkA y una secuencia de inmunoglobulina, que conserva la especificidad de unión del receptor TrkA (sustancialmente conserva la especificidad de unión del receptor trkA) y puede unirse a NGF.

35 Se conocen en la técnica inmunoadhesinas de TrkA y se ha encontrado que bloquean la unión de NGF al receptor TrkA. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.^o 6.153.189. Brennan *et al.* notifican la administración de inmunoadhesina de TrkA en un modelo de rata de dolor postquirúrgico. Véase Society for Neuroscience Abstracts 24 (1-2) 880 (1998). La inmunoadhesina de TrkA puede comprender una fusión de una secuencia de aminoácidos del receptor TrkA (o una parte de la misma) a partir del dominio extracelular de TrkA que puede unirse a NGF (en algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que conserva sustancialmente la especificidad de unión del receptor trkA) y una secuencia de inmunoglobulina. El receptor TrkA puede ser una secuencia de receptor TrkA humano, y la fusión es con una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina puede ser una secuencia de dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina. La asociación de dos fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina-receptor TrkA (por ejemplo, por medio de unión covalente mediante enlace(s) disulfuro) puede dar como resultado una estructura de tipo inmunoglobulina homodimérica. Una cadena ligera de inmunoglobulina puede asociarse adicionalmente con una o ambas de las quimeras de receptor TrkA-inmunoglobulina en el dímero con enlace disulfuro para proporcionar una estructura homotrimérica u homotetramérica. Los ejemplos de inmunoadhesinas de TrkA adecuadas incluyen las descritas en la patente estadounidense n.^o 6.153.189.

50 Un antagonista de NGF puede ser al menos un anticuerpo anti-TrkA que puede bloquear, suprimir, modificar y/o reducir la interacción física de NGF con el receptor TrkA y/o señalización secuencia abajo, mediante lo cual se reduce y/o bloquea una actividad biológica de NGF. Se conocen en la técnica anticuerpos anti-TrkA. Los anticuerpos anti-TrkA a modos de ejemplo incluyen los descritos en las publicaciones PCT n.^{os} WO 97/21732, WO 00/73344, WO 02/15924, y la publicación estadounidense n.^o 20010046959.

55 Un antagonista de NGF puede ser al menos un anticuerpo anti-p75 que puede bloquear, suprimir y/o reducir la interacción física de NGF con el receptor p75 y/o señalización secuencia abajo, mediante lo cual se reduce y/o bloquea una actividad biológica de NGF.

60 Un antagonista de NGF puede ser al menos un inhibidor de cinasa que puede inhibir la señalización de cinasa secuencia abajo asociada con la actividad de receptor TrkA y/o p75. Un inhibidor de cinasa a modo de ejemplo es K252a o K252b, que se conoce en la técnica y se describe en Knusel *et al.*, J. Neurochem. 59:715-722 (1992); Knusel *et al.*, J. Neurochemistry 57:955-962 (1991); Koizumi *et al.*, J. Neuroscience 8:715-721 (1988); Hirata

et al., Chemical Abstracts 111:728, XP00204135, véase abstract y 12th Collective Chemical Substance Index, pág. 34237, c. 3 (5-7), 55-60, 66-69), pág. 34238, c.1 (41-44), c.2 (25-27, 32-33), pág. 3423, c.3 (48-50, 52-53); y patente estadounidense n.º 6.306.849.

Se espera que varias otras categorías de antagonistas de NGF se identificarán si el médico las busca.

5 Identificación de anticuerpos anti-NGF y otros antagonistas de NGF

Pueden identificarse o caracterizarse anticuerpos anti-NGF y otros antagonistas de NGF usando procedimientos conocidos en la técnica, mediante los cuales se detecta y/o mide una reducción, mejora o neutralización de una actividad biológica de NGF. Por ejemplo, puede usarse un ensayo de activación de receptor de cinasa (KIRA) descrito en las patentes estadounidenses n.ºs 5.766.863 y 5.891.650, para identificar antagonistas de NGF. Este ensayo tipo ELISA es adecuado para la medición cualitativa o cuantitativa de activación de cinasa midiendo la autofosforilación del dominio cinasa de una de una proteína receptora tirosina cinasa (a continuación en el presente documento "rPTK"), por ejemplo receptor TrkA, así como también para la identificación y caracterización de posibles antagonistas de una rPTK seleccionada, por ejemplo, TrkA. La primera etapa del ensayo implica la fosforilación del dominio cinasa de un receptor de cinasa, por ejemplo, un receptor TrkA, estando presente el receptor en la membrana celular de una célula eucariota. El receptor puede ser un receptor endógeno o ácido nucleico que codifica para el receptor, o un constructo de receptor, puede transformarse en la célula. Normalmente, una primera fase sólida (por ejemplo, un pocillo de una primera placa de ensayo) se recubre con una población sustancialmente homogénea de tales células (normalmente una línea de células de mamífero) de modo que las células se adhieren a la fase sólida. Con frecuencia, las células son adherentes y de ese modo se adhieren de manera natural a la primera fase sólida. Si se usa un "constructo de receptor", normalmente comprende una fusión de un receptor de cinasa y un polipéptido flag. El polipéptido flag se reconoce por el agente de captura, con frecuencia un anticuerpo de captura, en la parte ELISA del ensayo. Entonces se añade un analito, tal como un anticuerpo anti-NGF candidato u otros antagonistas de NGF, junto con NGF a los pocillos que tienen las células adherentes, de manera que el receptor de tirosina cinasa (por ejemplo receptor TrkA) se expone a (o se pone en contacto con) NGF y el analito. Este ensayo permite la identificación de anticuerpos (u otros antagonistas de NGF) que inhiben la activación de TrkA mediante su ligando NGF. Tras la exposición a NGF y el analito, las células de adhesión se solubilizan usando un tampón de lisis (que tiene un detergente de solubilización en el mismo) y agitación suave, liberando de ese modo el lisado celular que puede someterse a la parte ELISA del ensayo directamente, sin la necesidad de concentración o clarificación del lisado celular.

El lisado celular así preparado está listo entonces para someterse a la etapa ELISA del ensayo. Como primera etapa en la etapa ELISA, una segunda fase sólida (normalmente un pocillo de una placa de microtitulación de ELISA) se recubre con un agente de captura (con frecuencia un anticuerpo de captura) que se une específicamente al receptor de tirosina cinasa, o, en el caso de un constructo de receptor, al polipéptido flag. El recubrimiento de la segunda fase sólida se lleva a cabo de modo que el agente de captura se adhiere a la segunda fase sólida. El agente de captura es generalmente un anticuerpo monoclonal, pero, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento, también pueden usarse anticuerpos policlonales. Entonces se expone el lisado celular obtenido a, o se pone en contacto con, el agente de captura de adhesión de modo que el receptor o constructo de receptor se adhiere a (o se captura en) la segunda fase sólida. Entonces se lleva a cabo una etapa de lavado, de modo que se elimine el lisado celular no unido, dejando el constructo de receptor o receptor capturado. El constructo de receptor o receptor capturado o de adhesión se expone entonces a, o se pone en contacto con, un anticuerpo anti-fosfotirosina que identifica residuos de tirosina fosforilada en el receptor de tirosina cinasa. En una realización, el anticuerpo anti-fosfotirosina está conjugado (directa o indirectamente) con una enzima que cataliza un cambio de color de un reactivo colorante no radiactivo. Por consiguiente, la fosforilación del receptor puede medirse por un cambio de color posterior del reactivo. La enzima puede unirse al anticuerpo anti-fosfotirosina directamente, o una molécula de conjugación (por ejemplo, biotina) puede conjugarse con el anticuerpo anti-fosfotirosina y la enzima puede unirse posteriormente al anticuerpo anti-fosfotirosina por medio de la molécula de conjugación. Finalmente, la unión del anticuerpo anti-fosfotirosina al constructo de receptor o receptor capturado se mide, por ejemplo, por un cambio de color en el reactivo colorante.

Los antagonistas de NGF también pueden identificarse incubando un agente candidato con NGF y monitorizando una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unión a NGF; (b) inhibición de actividad biológica de NGF o rutas secuencia abajo mediadas mediante la función de señalización de NGF; (c) inhibición, bloqueo o reducción de activación de receptor de NGF (incluyendo la autofosforilación y/o dimerización de TrkA); (d) aumento del aclaramiento de NGF; (e) tratamiento o prevención de cualquier aspecto del dolor postquirúrgico; (f) inhibición (reducción) de la síntesis, producción o liberación de NGF; (g) potenciación de la recuperación a partir de cirugía. En algunas realizaciones, un antagonista de NGF se identifica incubando un agente candidato con NGF y monitorizando la unión y la reducción o neutralización asociada de una actividad biológica de NGF. El ensayo de unión puede realizarse con polipéptido(s) de NGF purificado(s), o con células que expresan de manera natural, o transfectadas para expresar, polipéptido(s) de NGF. En una realización, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitivo, en el que se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un antagonista de NGF conocido por la unión a NGF. El ensayo puede realizarse en diversos formatos, incluyendo el formato ELISA. En otras realizaciones, un antagonista de NGF se identifica incubando un agente candidato con NGF y monitorizando la inhibición asociada de la autofosforilación y/o dimerización del receptor TrkA.

Tras la identificación inicial, la actividad de un antagonista anti-NGF candidato puede confirmarse adicionalmente y perfeccionarse mediante bioensayos, conocidos para someter a prueba las actividades biológicas seleccionadas como diana. Alternativamente, pueden usarse bioensayos para seleccionar candidatos directamente. Por ejemplo, NGF promueve varios cambios morfológicamente reconocibles en células de respuesta. Estos incluyen, pero no se limitan a, promover la diferenciación de células PC 12 y potenciar el crecimiento de neuritas a partir de estas células (Urfer *et al.*, *Biochem.* 36:4775-4781 (1997); Tsoulfas *et al.*, *Neuron* 10:975-990 (1993)), promover el crecimiento de neuritas a partir de explantes de ganglios simpáticos y sensoriales de respuesta (Levi-Montalcini, R. y Angeletti, P. Nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 48, 534-569, 1968) y promover la supervivencia de neuronas dependientes de NGF tales como neuronas de ganglio de raíz dorsal embrionario, ganglio trigeminal o ganglio simpático (por ejemplo, Chun & Patterson, *Dev. Biol.* 75:705-711, (1977); Buchman & Davies, *Development* 118:989-1001, (1993). Por tanto, el ensayo para determinar la inhibición de la actividad biológica de NGF implica cultivar células de respuesta a NGF con NGF más un analito, tal como un anticuerpo anti-NGF candidato y un antagonista de NGF candidato. Tras un tiempo apropiado se someterá a ensayo la respuesta celular (diferenciación celular, crecimiento de neuritas o supervivencia celular).

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

Composiciones para su uso en los procedimientos de la invención

Las composiciones usadas en los procedimientos de la invención comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF, y, en algunas realizaciones, comprenden además un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición es para su uso en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. También se describen ejemplos de tales composiciones, así como también cómo se formulan, en una sección anterior y a continuación. En una realización, la composición comprende un anticuerpo anti-NGF. En otra realización, la composición comprende uno o más antagonistas de NGF. En otra realización, la composición comprende uno o más antagonistas de NGF seleccionados de uno cualquiera o más de los siguientes: un antagonista (por ejemplo, un anticuerpo) que se une a (interacciona físicamente con) NGF, un antagonista que se une a un receptor de NGF (tal como un receptor TrkA y/o p75), y un antagonista que reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor de NGF secuencia abajo. Todavía en otras realizaciones, la composición comprende cualquier antagonista de NGF que no sea una inmunoadhesina de TrkA (es decir, distinto de una inmunoadhesina de TrkA). En otras realizaciones, la composición comprende cualquier antagonista de NGF que sea distinto de un anticuerpo anti-NGF. Todavía en otras realizaciones, la composición comprende cualquier antagonista de NGF que sea distinto de una inmunoadhesina de TrkA y distinto de un anticuerpo anti-NGF. En otras realizaciones, un antagonista de NGF inhibe (reduce) la síntesis, producción o liberación de NGF. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se une a NGF y no reacciona de manera cruzada significativamente con neurotrofinas relacionadas (tales como NT3, NT4/5 y/o BDNF). En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no está asociado con una respuesta inmunitaria adversa. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se selecciona del grupo constituido por un anticuerpo anti-NGF, una molécula antisentido dirigida frente a un NGF (incluyendo una molécula antisentido dirigida frente a un ácido nucleico que codifica para NGF), una molécula antisentido dirigida frente a un receptor de NGF (tal como TrkA y/o p75), un compuesto inhibidor de NGF, un análogo estructural de NGF, una mutación negativa dominante de un receptor TrkA que se une a un NGF, una inmunoadhesina de TrkA, un anticuerpo anti-TrkA, un anticuerpo anti-p75 y un inhibidor de cinasa. En otra realización, el antagonista de NGF es un anticuerpo anti-NGF. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF reconoce NGF humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es humano. Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF está humanizado (tal como anticuerpo E3 descrito en el presente documento). Todavía en otra realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una región constante que no provoca una respuesta inmunitaria no deseada o no esperada, tal como la lisis mediada por anticuerpo o ADCC. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende una o más CDR(s) de anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o, en algunas realizaciones, todas las seis CDR de E3).

Se entiende que las composiciones pueden comprender más de un antagonista de NGF. Por ejemplo, una composición puede comprender más de un miembro de una clase de antagonista de NGF (por ejemplo, una mezcla de anticuerpos anti-NGF que reconocen diferentes epítopos de NGF), así como también miembros de diferentes clases de antagonistas de NGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF y un compuesto inhibidor de NGF). Otras composiciones a modo de ejemplo comprenden más de uno de los anticuerpos anti-NGF que reconocen el(los) mismo(s) epítipo(s), diferentes especies de anticuerpos anti-NGF que se unen a diferentes epítopos de NGF, o diferentes compuestos inhibidores de NGF.

La composición usada en la presente invención puede comprender además vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 20^a Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover.), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones, y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro

de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tal como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG). Se describen adicionalmente en el presente documento excipientes farmacéuticamente aceptables. El antagonista de NGF y composiciones del mismo también pueden usarse conjuntamente con otros agentes que sirven para potenciar y/o complementar la eficacia de los agentes.

Kits

Los kits de la invención incluyen uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo anti-NGF (tal como anticuerpo humanizado E3 descrito en el presente documento), y en algunas realizaciones, comprenden además instrucciones para su uso según cualquiera de los procedimientos de la invención descritos en el presente documento. En alguna realización, el kit comprende un anticuerpo anti-NGF (tal como anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En otras realizaciones, el kit comprende un anticuerpo anti-NGF que comprende uno o más CDR(s) de anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o, en algunas realizaciones, todas las seis CDR de E3). En algunas realizaciones, estas instrucciones comprenden una descripción de la administración del antagonista de NGF para tratar, mejorar o prevenir el dolor postquirúrgico según cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. El kit puede comprender además una descripción de la selección de un individuo adecuado para el tratamiento basándose en identificar si ese individuo tiene dolor postquirúrgico o si el individuo está en riesgo de dolor postquirúrgico. Todavía en otras realizaciones, la instrucción comprende una descripción de la administración de un antagonista de NGF para tratar, prevenir y/o mejorar el dolor postquirúrgico. Todavía en otras realizaciones, las instrucciones comprenden una descripción de la administración de un antagonista de NGF a un individuo en riesgo de dolor postquirúrgico.

Las instrucciones en relación con el uso de un anticuerpo anti-NGF generalmente incluyen información en cuanto a dosificación, programa de dosificación y vía de administración para el tratamiento pretendido. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, envases voluminosos (envases de múltiples dosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención son instrucciones normalmente escritas en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables instrucciones legibles por máquina (por ejemplo, instrucciones soportadas en un disco de almacenamiento óptico o magnético).

La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar, mejorar y/o prevenir el dolor postquirúrgico. Pueden proporcionarse instrucciones para poner en práctica cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Los kits de esta invención están en envases adecuados. Los envases adecuados incluyen, pero no se limitan a, viales, frascos, botes, envases flexibles (por ejemplo, bolsas de plástico o Mylar selladas), y similares. También se contemplan envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, tales como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede puncionarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede puncionarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un antagonista de NGF, tal como un anticuerpo anti-NGF. El recipiente puede comprender además un segundo agente farmacéuticamente activo.

Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto(s) en o asociados con el recipiente.

Administración de un anticuerpo anti-NGF y evaluación del tratamiento

El anticuerpo anti-NGF puede administrarse a un individuo por medio de cualquier vía adecuada. Por ejemplo, el anticuerpo anti-NGF puede administrarse por vía oral, por vía intravenosa, por vía sublingual, por vía subcutánea, por vía intraarterial, por vía intrasinovial, intravescicular (tal como por medio de la vejiga), por vía intramuscular, por vía intracardiaca, por vía intratorácica, por vía intraperitoneal, por vía intraventricular, por vía sublingual, mediante inhalación, mediante supositorio y por vía transdérmica. Pueden administrarse por vía ora, por ejemplo, en forma de comprimidos, trociscos, capsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, chupachús, chicle o similares preparados mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Debería ser evidente para un experto en la técnica que los ejemplos descritos en el presente documento no pretenden ser limitativos sino que son ilustrativos de las técnicas disponibles.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se administra a un individuo según procedimientos conocidos, tal como administración intravenosa, por ejemplo, como bolo o mediante infusión

continua a lo largo de un periodo de tiempo, mediante vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, de inhalación o tópica. Son útiles para la administración nebulizadores comercialmente disponibles para formulaciones líquidas, incluyendo nebulizadores de chorro y nebulizadores ultrasónicos. Pueden nebulizarse directamente formulaciones líquidas y puede nebulizarse polvo liofilizado tras la reconstitución. Alternativamente, el anticuerpo anti-NGF puede aerosolizarse usando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida o inhalarse como polvo molido y liofilizado.

En una realización, un anticuerpo anti-NGF se administra por medio de técnicas de administración local seleccionada como diana o específica del sitio. Los ejemplos de técnicas de administración local seleccionada como diana o específica del sitio incluyen diversas fuentes de depósito implantables del antagonista de NGF o catéteres de administración local, tal como catéteres de infusión, un catéter de drenaje o un catéter de aguja, injertos sintéticos, envolturas adventiciales, derivaciones y endoprótesis u otros dispositivos implantables, vehículos específicos del sitio, inyección directa o aplicación directa. Véase, por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 00/53211 y la patente estadounidense n.º 5.981.568.

Pueden usarse diversas formulaciones de un anticuerpo anti-NGF para la administración. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-NGF puede administrarse puro. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF puede estar en diversas formulaciones, incluyendo formulaciones que comprenden un excipiente farmacéuticamente aceptable. Se conocen en la técnica excipientes farmacéuticamente aceptables, y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede proporcionar forma o consistencia o actuar como diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes estabilizadores, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes de encapsulación, tampones y potenciadores de la penetración en la piel. Se exponen excipientes así como también formulaciones para la administración de fármacos parenteral y no parenteral en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing (2000).

En algunas realizaciones, estos agentes se formulan para la administración mediante inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intramuscular, etc.). Por consiguiente, estos agentes pueden combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, disolución de dextrosa y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, duración y repetición, dependerá del individuo particular y el historial médico del individuo.

Un anticuerpo anti-NGF puede administrarse usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo mediante inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intramuscular, etc.). También pueden administrarse anticuerpos anti-NGF por medio de inhalación, tal como se describe en el presente documento. Generalmente, para la administración de anticuerpos anti-NGF, una dosificación candidata inicial puede ser de aproximadamente 2 mg/kg. Para el fin de la presente invención, una dosificación diaria típica podría oscilar entre aproximadamente cualquiera de 3 µg/kg y 30 µg/kg y 300 µg/kg y 3 mg/kg, y 30 mg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo del estado, el tratamiento es sostenido hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas o hasta que se logren niveles terapéuticos suficientes para reducir el dolor postquirúrgico. Un régimen de dosificación a modo de ejemplo comprende administrar una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguida de un dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo anti-NGF, o seguida de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada otra semana. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de disminución farmacocinética que el médico desea alcanzar. Por ejemplo, se contempla la dosificación de una-cuatro veces por semana. La evolución de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluyendo el(los) antagonista(s) de NGF usado(s)) puede variar a lo largo del tiempo.

En general, cuando no es un anticuerpo, un antagonista de NGF puede administrarse (en algunas realizaciones comparativas) a la tasa de aproximadamente 0,1 mg/kg a 300 mg/kg del peso del paciente dividido en de una a tres dosis, o tal como se da a conocer en el presente documento. En algunas realizaciones, para un paciente adulto de peso normal, pueden administrarse dosis que oscilan entre aproximadamente 0,3 mg/kg y 5,00 mg/kg. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, duración y repetición, dependerá del individuo particular y el historial médico del individuo, así como también las propiedades de los agentes individuales (tales como la semivida del agente y otras consideraciones bien conocidas en la técnica).

Para el fin de la presente invención, la dosificación apropiada de un anticuerpo anti-NGF dependerá del(de los) anticuerpo(s) anti-NGF (o composiciones de los mismos) empleada, el tipo y la gravedad del dolor que va a tratarse, si el agente se administra para fines terapéuticos o preventivos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al agente, y el criterio del médico responsable. Normalmente el médico administrará un anticuerpo anti-NGF, hasta que se alcance una dosificación que logre el resultado deseado.

Las consideraciones empíricas, tales como semivida, generalmente contribuirán a la determinación de la dosificación. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos que son compatibles con el sistema inmunitario humano, tales como anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos, para prolongar la semivida del anticuerpo y para evitar que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmunitario huésped. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse a lo largo del transcurso de la terapia, y generalmente se basa, pero no necesariamente, en

el tratamiento y/o supresión y/o mejora y/o retraso del dolor. Alternativamente, pueden ser apropiadas formulaciones de liberación continua sostenida de anticuerpos anti-NGF. Se conocen en la técnica diversas formulaciones y dispositivos para lograr la liberación sostenida.

5 En una realización, pueden determinarse dosificaciones para un anticuerpo anti-NGF empíricamente en individuos a los que se les ha proporcionado una o más administraciones de un anticuerpo. Se proporcionan a individuos dosificaciones en incremento de un anticuerpo anti-NGF. Para evaluar la eficacia de un anticuerpo anti-NGF, puede seguirse un indicador del dolor.

10 La administración de un anticuerpo anti-NGF según el procedimiento en la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del receptor, si el fin de la administración es terapéutico o profiláctico y otros factores conocidos por los médicos expertos. La administración de un anticuerpo anti-NGF puede ser esencialmente continua a lo largo de un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciada, por ejemplo, o bien antes, durante, o bien después del desarrollo del dolor; antes, durante; antes y después; durante y después; antes y durante; o antes, durante, y después del desarrollo del dolor. La administración puede ser antes, durante y/o después de la herida, incisión, traumatismo, cirugía y cualquier otro acontecimiento que probablemente da lugar a dolor postquirúrgico.

15 En algunas realizaciones, pueden estar presentes más de un antagonista de NGF, tal como un anticuerpo. El antagonista puede ser el mismo o diferente uno de otro. Pueden estar presentes al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco antagonistas de NGF diferentes. Generalmente, los antagonistas de NGF tienen actividades complementarias que no afectan de manera adversa entre sí. También pueden usarse antagonistas de NGF conjuntamente con otros agentes que sirven para potenciar y/o complementar la eficacia de los agentes.

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

35 Se preparan liposomas que contienen el anticuerpo anti-NGF mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); y las patentes estadounidenses n.ºs 4.485.045 y 4.544.545. Se dan a conocer liposomas con aumento del tiempo de circulación en la patente estadounidense n.º 5.013.556. Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada de PEG (PEG-PE). Se someten a extrusión liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado.

40 Los principios activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se dan a conocer en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. Mack Publishing (2000).

45 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos (patentes estadounidense n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de 7-etilo, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradable tales como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), isobutirato acetato de sacarosa y poli-(ácido D-(-)-3hidroxibutírico).

50 Las formulaciones que van a usarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza

fácilmente mediante, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estériles. Generalmente se colocan composiciones terapéuticas de anticuerpo anti-NGF en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, un vial o una bolsa de disolución intravenosa que tiene un tapón puncionable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

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

10 Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, se mezcla el principio activo principal con un vehículo farmacéutico, por ejemplo componentes de formación de comprimidos convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. Cuando se denominan homogéneas estas composiciones de preformulación, significa que el principio activo está disperso de manera uniforme por toda la composición de modo que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida se subdivide entonces en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que contienen desde 0,1 mg hasta aproximadamente 500 mg del principio activo de la presente invención. Los comprimidos o las píldoras de la composición novedosa pueden estar recubiertos o compuestos de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que proporciona la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o la píldora puede comprender un componente de dosificación interna y un componente de dosificación externa, estando el último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto hacia el duodeno o que se retrase su liberación. Puede usarse una variedad de materiales para tales capas entéricas o recubrimientos, tales materiales incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

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

30 Pueden prepararse emulsiones adecuadas usando emulsiones de grasa disponibles comercialmente, tales como IntralipidTM, LiposynTM, InfonutrolTM, LipofundinTM y LipiphysanTM. El principio activo o bien puede disolverse en una composición de emulsión premezclada o bien alternativamente puede disolverse en un aceite (por ejemplo aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz o aceite de almendras) y una emulsión formada tras mezclar con un fosfolípido (por ejemplo fosfolípidos de huevo, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que pueden añadirse otros componentes, por ejemplo glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas contendrán normalmente hasta el 20% de aceite, por ejemplo, entre el 5% y el 20%. La emulsión de grasa puede comprender gotas de grasa entre 0,1 μm y 40 1,0 μm , particularmente 0,1 μm y 0,5 μm , y tienen un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0.

Las composiciones de emulsión pueden ser las preparadas mezclando un antagonista de factor de crecimiento nervioso con IntralipidTM o los componentes de las mismas (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

45 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes orgánicos o acuosos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados tal como se expusieron anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía respiratoria nasal u oral para el efecto local o sistémico. Pueden nebulizarse mediante el uso de gases composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferiblemente estériles. Las disoluciones nebulizadas pueden aspirarse directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede estar unido a una máscara facial, una cámara o máquina de respiración con presión positiva intermitente. Pueden administrarse composiciones en disolución, suspensión o polvo, preferiblemente por vía oral o por vía nasal, desde dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada.

Puede evaluarse la eficacia de tratamiento mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

55 EJEMPLOS

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

Ejemplo 1

El anticuerpo monoclonal anti-NGF es eficaz en el tratamiento de dolor postquirúrgico

Se usó un modelo de dolor que imita el dolor postquirúrgico para evaluar la eficacia del tratamiento con anticuerpo anti-NGF 911 (un anticuerpo monoclonal de ratón; véase Hongo, *et al.*, *Hybridoma* 19:215-227 (2000). Cada experimento implicó 16 animales (n=8 por grupo). Se inyectó el anticuerpo anti-NGF por vía intraperitoneal (i.p.) a diversas concentraciones por experimento (35 miligramos o 7 miligramos por kilogramo) 15 horas antes de la incisión. El grupo control no recibió anticuerpo pero se le inyectó i.p. una solución salina.

Animales. Se adquirieron ratas Sprague Dawley macho que pesaban entre 220-240 gramos de Harlan (San Diego) y se aclimataron a la instalación de animales durante una semana antes de la cirugía.

Cirugía. La cirugía se basó en el procedimiento descrito por Brennan, *et al.* *Pain* 64:493-501 (1996). Se anestesiaron los animales con un 2% de isoflurano en mezcla de aire que se mantuvo durante la cirugía por medio de un cono de nariz. Se preparó la superficie plantar de la pata trasera derecha con una almohadilla de yoduro de povidona y se realizó una incisión longitudinal central de 1-cm a través de la piel y fascia, empezando 0,5 cm desde el borde del talón y extendiéndose hacia los dedos. Se realizaron mediciones con una regla manteniendo el pie en una posición flexionada. Se elevó el músculo plantar usando fórceps curvados y se realizó la incisión longitudinalmente. Se realizó la incisión en el músculo a través de su profundidad completa, entre el origine y la inserción. Se controló la hemorragia durante toda la cirugía mediante presión aplicada mediante una almohadilla de gasa. Se cerró la herida con dos suturas de colchón (monofilamento negro ethilon 5-0). Se anudaron estas suturas 5-6 veces, atándose el primer nudo ligeramente. Se limpió el sitio de la herida con disolución de bacitracina. Se dejó a los animales que se recuperaran y reposaran en jaulas limpias durante dos horas o más antes de comenzar las pruebas de comportamiento.

Evaluación del dolor en reposo. Se usó una puntuación de dolor acumulativo para evaluar el dolor relacionado con el soporte de peso. Se colocaron los animales en una malla de plástico (rejilla: 8 mm²) en jaulas de plástico transparente que estaban elevadas en una plataforma (a: 45,72 cm) permitiendo la inspección de la parte inferior de sus patas. Tras un periodo de aclimatación de 20 minutos, se evaluó el soporte de peso en una escala de 0 a 2. Se dio una puntuación de 0 si la pata se palidecía o estaba presionada contra la malla, lo que indicaba un soporte de peso completo. Se dio una puntuación de 1 si la pata estaba en conformidad con la piel justo tocando la malla, sin palidecer o sin formación de muescas de la piel. Se dio una puntuación de 2 si la pata se mantenía completamente fuera de la malla. El encogimiento de la pata se considero un 2 si la rata estaba todavía en reposo. Se observó cada animal durante 1 minuto cada 5 minutos durante 30 minutos. Se usó la suma de 6 puntuaciones (0-12) obtenidas durante 1/2 horas para evaluar el dolor en el pie con incisión. También se calculó la frecuencia de puntuaciones de 2 y se usó para evaluar la incidencia de dolor grave o postura antiálgica de la pata por el animal. Se sometió a prueba cada animal 24 horas antes de la cirugía (referencia), y 2 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la intervención quirúrgica. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 1, que representa la puntuación de dolor en reposo acumulativo observada en animales tratados con 35 mg/kg de anticuerpo de ratón 911 anti-NGF. Estos resultados demostraron que el tratamiento con anticuerpo anti-NGF redujo significativamente el dolor en reposo postquirúrgico. El soporte de peso era una buena correlación de cómo estaba el animal de dispuesto a usar la extremidad, y por tanto era una medida eficaz del alivio de dolor.

Evaluación del dolor evocado mecánicamente usando alodinia táctil. Se midió la alodinia táctil con filamentos de Semmes-Weinstein von Frey (Stoelting, Wood Dale, IL). Se colocaron los animales en jaulas de base de malla de plástico de 12 mm, elevadas en una plataforma (a: 18") permitiendo el acceso a la parte inferior de sus patas. Los animales se habituaron a este entorno (a lo largo de 1-2 días de la semana anterior) antes del inicio del experimento. Tras un periodo de aclimatación de 15 minutos, se sometió a prueba la alodinia táctil tocando la piel, en la parte media y proximal al punto de entrada de la incisión, en el talón de la pata trasera del animal con filamentos de von Frey en orden ascendente de fuerza hasta que se provocó una respuesta e retirada de la pata. Se usaron números de von Frey de 4,08 a 5,46; cada número se correlaciona con una fuerza en gramos, tal como se describe a continuación. Cada filamento de von Frey se aplicó en la superficie en un ángulo recto, doblando el filamento durante 2 s, o hasta que se produjo una respuesta. Una vez se estableció la respuesta de retirada, se volvió a someter a prueba la pata para dos ensayos más, comenzando con el siguiente filamento de von Frey descendente hasta que no se produjo respuesta.

Se registró la cantidad menor de fuerza requerida para provocar una respuesta a lo largo de los tres ensayos como el umbral de retirada en gramos. La fuerza mayor de 29 g levantó la pata así como que provocó una respuesta, representando de ese modo el punto de corte. Si no se detectó respuesta, se registró el siguiente filamento ascendente "5,88". Se sometieron a prueba ambas patas izquierda y derecha de esta manera. Se sometió a prueba cada animal 24 horas antes de la cirugía (referencia), y 2 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la intervención quirúrgica. Se sometió a prueba la alodinia táctil tras la puntuación de dolor en reposo. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 3, que proporciona la puntuación acumulativa en respuesta a la estimulación mecánica en animales tratados con 7 mg/kg de anticuerpo anti-NGF 911. Estos resultados demostraron que el tratamiento con anticuerpo anti-NGF redujo el dolor evocado mecánicamente postquirúrgico.

Evaluación de hiperalgesia térmica. Se evaluó la hiperalgesia térmica mediante la prueba plantar de rata (Ugo Basile, Italia) siguiendo un procedimiento modificado de Hargreaves, *et al.* (1988). Se habituaron las ratas al aparato que estaba constituido por cuatro cajas de metacrilato individuales en una mesa de cristal elevada. Se colocó una fuente de calor radiante móvil debajo de la mesa y se focalizó sobre la pata trasera. Mientras el animal está quieto, pero no dormido, se aprieta el botón de la caja control, se enciende la fuente de calor radiante y se

registra automáticamente el tiempo que tarda el animal en retirarse de la fuente de calor. Esta latencia de retirada de la pata (PWL) se detecta mediante un detector de luz incrustado en la fuente de calor radiante que percibe el movimiento de la pata de la rata mediante un cambio de la reflectancia de la fuente radiante. Se registraron las latencias de retirada de la pata en segundos. Había un punto de corte automático de 22,5 s para evitar el daño tisular. Se tomaron PWL de tres a cuatro veces para ambas patas traseras de cada animal, la media de las cuales representaban líneas base para las patas traseras derecha e izquierda. Los resultados se presentan como la proporción de la puntuación medida en la pata derecha (sitio de cirugía) y la pata izquierda. El aparato se calibró una vez (al comienzo del estudio) y se ajustó a una intensidad de 40 para dar una PWL normal de aproximadamente 6 segundos. Se sometió a prueba cada animal 24 horas antes de la cirugía (referencia), y 3 h, 24 h, 48 h y 72 h tras la intervención quirúrgica. Se tomaron las mediciones de hiperalgesia térmica tras las mediciones de alodinia táctil. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 2, que representa la puntuación acumulativa observada en animales tratados con 35 mg/kg de anticuerpo anti-NGF 911 en respuesta a la estimulación térmica. Estos resultados demostraron que el tratamiento con anticuerpo anti-NGF redujo significativamente la hiperalgesia térmica postquirúrgica.

15 Ejemplo 2

Tratamiento del dolor postquirúrgico usando un anticuerpo anti-NGF humanizado y comparación con tratamiento de opioides del dolor postquirúrgico

Se sometió a prueba el efecto de un anticuerpo anti-NGF humanizado designado E3 sobre el dolor postquirúrgico en un modelo animal para el dolor postquirúrgico tal como se describió en el ejemplo 1. El anticuerpo E3 comprende la región constante de IgG2a de cadena pesada humana que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 por S330S331 (numeración de aminoácidos con respecto a la secuencia de IgG2a de tipo natural; véase Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); la región constante kappa de cadena ligera humana; y las regiones variables de cadena ligera y pesada mostradas en las tablas 1 y 2.

Se inyectó el anticuerpo anti-NGF por vía intraperitoneal (i.p.) a diversas concentraciones del anticuerpo (0,004, 0,01, 0,02, 0,1, 0,6 y 1 mg por kilogramo de peso de animal) a las 15 horas antes de la incisión. El grupo control negativo no recibió anticuerpo pero se le inyectó i.p. una solución salina. Se inyectó i.p. fentanilo a 0,01 mg/kg como control positivo 30 minutos antes de someter a prueba a las 24 horas tras la cirugía. Cada experimento implicó 8 animales (n=8 por grupo) para cada estado, y el grupo control tenía 56 animales. Se realizó la cirugía y se midió una puntuación de dolor acumulativo tal como se describió en el ejemplo 1, excepto que las ratas Sprague Dawley macho se adquirieron de Harlan (Wisconsin). Se valuó el dolor en reposo veinticuatro horas tras la cirugía tal como se describió en el ejemplo 1.

Tal como se muestra en la figura 4, el anticuerpo anti-NGF humanizado E3 redujo significativamente el dolor en reposo ($p < 0,05$) tras la cirugía cuando se administró a una dosificación de 0,02 mg/kg a 1 mg/kg. Un “**” indica una diferencia significativamente significativa del control ($p < 0,05$). El tratamiento con 0,02 mg/kg alivió el comportamiento de dolor al menos de manera tan eficaz como el tratamiento con 0,01 mg/kg de fentanilo. Esta dosis de fentanilo es 10 veces la dosis humana normal de este potente opioide.

35 Ejemplo 3

Tratamiento antes de la cirugía y después de la cirugía del dolor postquirúrgico con un anticuerpo anti-NGF

Se sometió a prueba la eficacia de un anticuerpo anti-NGF para reducir el dolor postquirúrgico cuando se administró de manera postincisional en el modelo animal de dolor postquirúrgico descrito en el ejemplo 1, usando ratas Sprague Dawley macho adquiridas de Harlan (Wisconsin). Se inyectó por vía intravenosa (i.v.) el anticuerpo anti-NGF humanizado E3 (0,5 mg/kg) dos horas tras la incisión. El grupo control no recibió anticuerpo pero se le inyectó i.v. una solución salina. Se realizó la cirugía y se evaluó el dolor en reposo expresado como una puntuación de dolor acumulativo 24 horas tras la cirugía tal como se describió en el ejemplo 1. Tal como se muestra en la figura 5, el tratamiento con anticuerpo anti-NGF redujo significativamente ($p < 0,05$) el dolor en reposo a las veinticuatro horas tras la incisión cuando se administró el anticuerpo 2 horas tras la incisión. Estos resultados demostraron que anti-NGF alivia de manera eficaz el dolor postquirúrgico cuando se administró tras la cirugía.

Se sometió a prueba la eficacia de un anticuerpo anti-NGF para reducir el dolor postquirúrgico cuando se administró 14 días o 21 días antes de la incisión en el modelo animal descrito en el ejemplo 1, usando ratas Sprague Dawley macho adquiridas de Harlan (Wisconsin). Se inyectó i.p. el anticuerpo monoclonal de ratón anti-NGF 911 a diversas concentraciones (1 mg/kg o 5 mg/kg) a los 14 días o 21 días antes de la incisión. Al grupo control se le inyectó i.p. una solución salina. Se realizó la cirugía y se evaluó el dolor en reposo expresado como una puntuación de dolor acumulativo 24 horas tras la cirugía tal como se describió en el ejemplo 1. Tal como se muestra en las figuras 6 y 7, el anticuerpo anti-NGF 911 redujo significativamente el dolor en reposo a la dosificación de 5 mg/kg cuando se administró 14 días antes de la cirugía, y redujo el dolor en reposo cuando se inyectó 21 días antes de la cirugía.

50 Ejemplo 4

El tratamiento con anticuerpo anti-NGF no muestra ningún efecto sobre la cicatrización de heridas

Existen indicios en la bibliografía científica de que el tratamiento con NGF en exceso puede promover la cicatrización de heridas en animales diabéticos (Matsuda *et al.* (1998) *J. Exp Med* 187(3):297-30) y piel y úlceras corneales (Lambiase *et al.*, (2003) *Arch Ital Biol.* 141(2-3):141-8). Para determinar si el uso de anticuerpo anti-NGF afectaría a la cicatrización de heridas, se sometió a prueba el efecto del tratamiento con anticuerpo anti-NGF sobre la cicatrización de heridas en ratas.

Se adquirieron ratas Sprague-Dawley macho que pesaban 250-350 gramos de Harlan (Wisconsin), se llevaron a la instalación y se aclimataron durante al menos una semana. Se anestesiaron los animales con isoflurano y se rasuró la superficie dorsal (espalda) y se limpió con yoduro de povidona seguido de una almohadilla de alcohol. Se realizó una incisión de 2,5 cm a través de la piel en la línea central entre las escápulas. Se controló la hemorragia con presión con una almohadilla de gasa. Se cerró la herida con cuatro únicas suturas ethilon 4-0 y se dejó que los animales se recuperaran. Entonces se dividieron los animales en tres grupos: un grupo que recibió una única dosis de anticuerpo monoclonal de ratón anti-NGF 911 en el momento de cirugía (1 mg/kg, i.p.); un grupo que recibió ketorolaco (5 mg/kg diariamente durante cinco días partiendo del día de la cirugía, por vía intramuscular (IMO) como control positivo; y un grupo control tratado con solución salina (control negativo). Se sabe que ketorolaco inhibe la cicatrización de heridas. Haws *et al.* (1996) *Ann Plast Surg.* 37(2):147-51; Gerstenfeld *et al.* (2003) *J Orthop Res.* 21(4):670-5.

Se examinó la zona de la incisión y fotografió diariamente partiendo del día uno tras la cirugía. Se retiraron las suturas Sutures el día 2 tras la cirugía. Se clasificaron las incisiones como "intacta" si toda la incisión seguía estando cerrada y "fallida" si alguna parte o toda la incisión se volvía a abrir. Se expresaron los resultados como proporción de heridas intactas (es decir, el número de heridas intactas dividido entre el número total de animales clasificados).

Tal como se muestra en la figura 8, la cicatrización de heridas de animales tratados con anticuerpo anti-NGF 911 no era significativamente diferente de la de animales tratados con solución salina. Por tanto, el tratamiento con anti-NGF no mostró ningún efecto aparente sobre la cicatrización de heridas. Por el contrario, se inhibió la cicatrización de heridas significativamente en animales tratados con ketorolaco cuando se comparó con animal tratado con solución salina o anticuerpo anti-NGF 911 ($p < 0,0005$).

También se examinó el aspecto histológico de las heridas cicatrizadas en tres ratas tratadas con anticuerpo anti-NGF y tres ratas tratadas con solución salina. 21 días tras la incisión se sacrificó a los animales y se fijó la muestra de piel incluyendo la zona de la incisión en formalina, se incrustó en parafina y se seccionó por el sitio de la incisión. Estas secciones se trataron con anticuerpo anti-NGF o solución salina, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron por un patólogo veterinario ciego al tratamiento de animales. No se observaron anomalías de la cicatrización de heridas en ningún grupo de ratas.

Ejemplo 5 – ejemplo comparativo

Tratamiento de dolor postquirúrgico con antagonista de NGF de molécula pequeña, K252a

Se sometió a prueba la eficacia del antagonista de NGF K252a para tratar el dolor postquirúrgico en el modelo de incisión descrito en el ejemplo 1. Se preparó una disolución de 25 mg/ml de K252a en DMSO. A 250 μ l de esta disolución, se le añadieron 3500 μ l de una disolución de ciclodextrina al 45% y se mezcló bien. Entonces se añadieron 3750 μ l de solución salina para preparar una concentración final de 0,8333 mg/ml de K252a. Los animales (obtenidos tal como se describió en el ejemplo 2) recibieron la incisión y se evaluó el dolor en reposo tal como se describió en el ejemplo 1. Se determinó el dolor en reposo acumulativo de "referencia" a las 24 horas tras la incisión. Entonces, K252a se inyectó i.p. a 4 mg/kg en los animales de prueba, y a los animales control se les inyectó una disolución de vehículo (una disolución que contenía todos los componentes de la disolución de K252a excepto K252a). Se determinaron las puntuaciones de dolor en reposo acumulativo una hora tras el tratamiento con K252a o vehículo (marcado "1H-P-tmt en la figura) y tres horas tras el tratamiento con K252 o vehículo (marcado "3H-P-Tmt en la figura) por un investigador ciego al tratamiento. Tal como se muestra en la figura 9, el tratamiento con K252a redujo significativamente el dolor en reposo ($p < 0,005$) a las tres horas tras la dosificación, mientras que el tratamiento con vehículo no lo hizo. Estos resultados demuestran que un tratamiento con K252a redujo el dolor en reposo hasta el mismo grado que lo que hizo el tratamiento con anticuerpo anti-NGF en experimentos similares.

Ejemplo 6

Comparación de dolor postquirúrgico en animales tratados con anticuerpo anti-NGF o anticuerpo control de isotipo afín

Con el fin de demostrar que el efecto analgésico del anticuerpo anti-NGF requería la inhibición de NGF, se comparó la eficacia de anticuerpo de ratón anti-NGF 911 para tratar el dolor postquirúrgico con la eficacia de la misma dosis de un anticuerpo de murino control de isotipo afín que es inmunorreactivo con la proteína amnésica de *Drosophila*. Se realizó el experimento como en el ejemplo 1, excepto que las ratas Sprague-Dawley se adquirieron de Harlan (Wisconsin). Se trataron las ratas IP quince horas antes de la cirugía con 1 mg/kg de o bien el anticuerpo anti-NGF 911 (marcado "911" en la figura) o bien anticuerpo anti-amnésica de isotipo afín (marcado "amn ab" en la figura). A las veinticuatro horas tras la cirugía, se evaluó el dolor en reposo (puntuación de dolor acumulativo) por un observador ciego al tratamiento de los animales. Tal como se muestra en la figura 10, el tratamiento con anticuerpo

anti-NGF 911 redujo significativamente ($p < 0,005$) el dolor en reposo en comparación con animales tratados con el anticuerpo anti-amnésica. Estos resultados demostraron que el efecto analgésico del tratamiento con anticuerpos anti-NGF es específico.

5 Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de entendimiento, las descripciones y ejemplos no deberían interpretarse como limitativas del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> RINAT NEUROSCIENCE CORP.

10 <120> PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR DOLOR POSTQUIRÚRGICO MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE UN ANTAGONISTA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO Y COMPOSICIONES QUE CONTIENEN AL MISMO

<130> N.94354 SER

<140> EP 03779091.2

<141> 08-10-2003

15 <150> PCT/US2003/032089

<151> 08-10-2003

<150> US 60/417.237

<151> 08-10-2002

<160> 2

20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 1

```

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

<210> 2

30 <211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 2

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

5

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-NGF para su uso en el tratamiento de dolor postquirúrgico.
2. Un anticuerpo anti-NGF según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-NGF es para su uso para suprimir o mejorar el dolor en reposo.
- 5 3. Un anticuerpo anti-NGF según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-NGF es para su uso para suprimir o mejorar el dolor inducido mecánicamente.
4. Un anticuerpo anti-NGF según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo anti-NGF es un anticuerpo humano.
- 10 5. Un anticuerpo anti-NGF según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo anti-NGF es un anticuerpo humanizado.
6. Un anticuerpo anti-NGF según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo anti-NGF está unido a NGF humano.
7. Un anticuerpo anti-NGF según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo anti-NGF está unido a NGF humano con una afinidad de unión de aproximadamente 0,1 nM.
- 15 8. Un anticuerpo anti-NGF según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo anti-NGF está unido a NGF humano con una afinidad de unión de entre aproximadamente 2 pM y 22 pM.
9. Un anticuerpo anti-NGF según la reivindicación 8, en el que el anticuerpo anti-NGF está unido a un epítipo de NGF que comprende uno o más: residuos K32, K34 y E35 dentro de la región variable 1 (aminoácidos 23-35) de hNGF, residuos F79 y T81 dentro de la región variable 4 (aminoácidos 81-88) de hNGF; residuos H84 y K88 dentro de la región variable 4; residuo R103 entre la región variable 5 (aminoácidos 94-98) de hNGF y el extremo C-terminal (aminoácidos 111-118) de hNGF; residuo E11 dentro de la región prevariable 1 (aminoácidos 10-23) de hNGF; Y52 entre la región variable 2 (aminoácidos 40-49) de hNGF y la región variable 3 (aminoácidos 59-66) de hNGF; residuos L112 y S113 dentro del extremo C-terminal de hNGF; residuos R59 y R69 dentro de la región variable 3 de hNGF; o residuos V18, V20 y G23 dentro de la región prevariable 1 de hNGF.
- 20
- 25 10. Uso de un anticuerpo anti-NGF en la fabricación de un fármaco para tratar el dolor postquirúrgico.
11. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de dolor postquirúrgico que comprende un anticuerpo anti-NGF y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

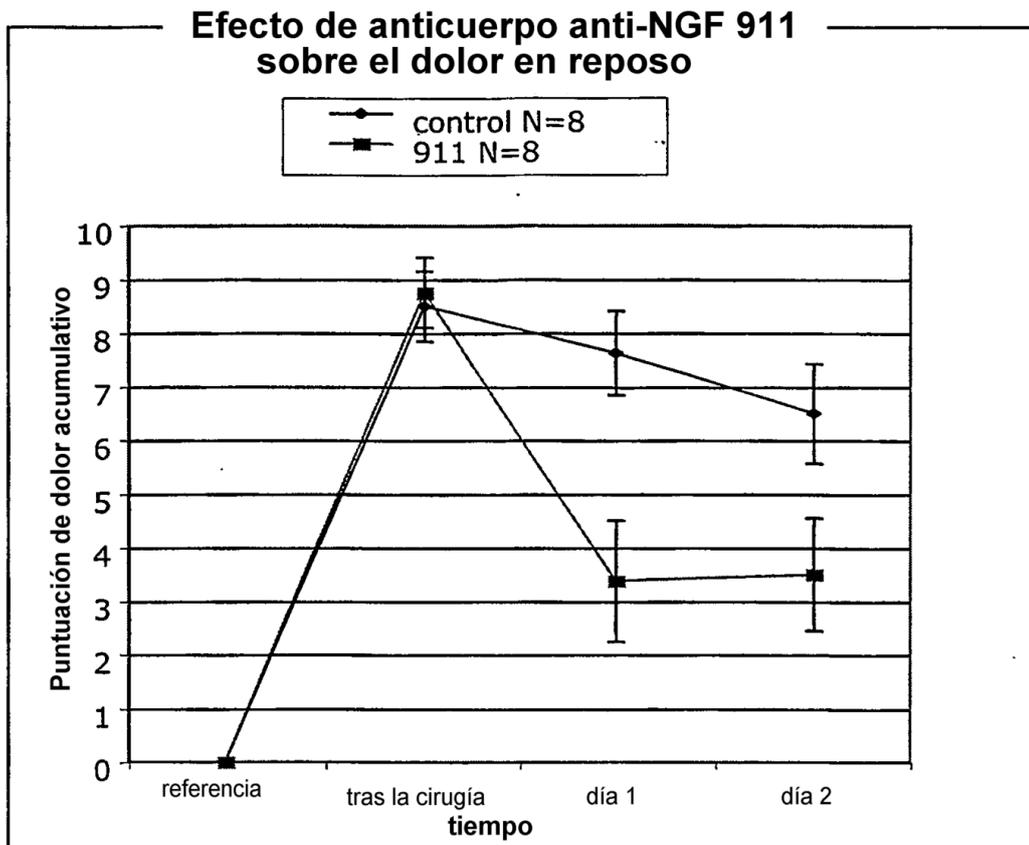
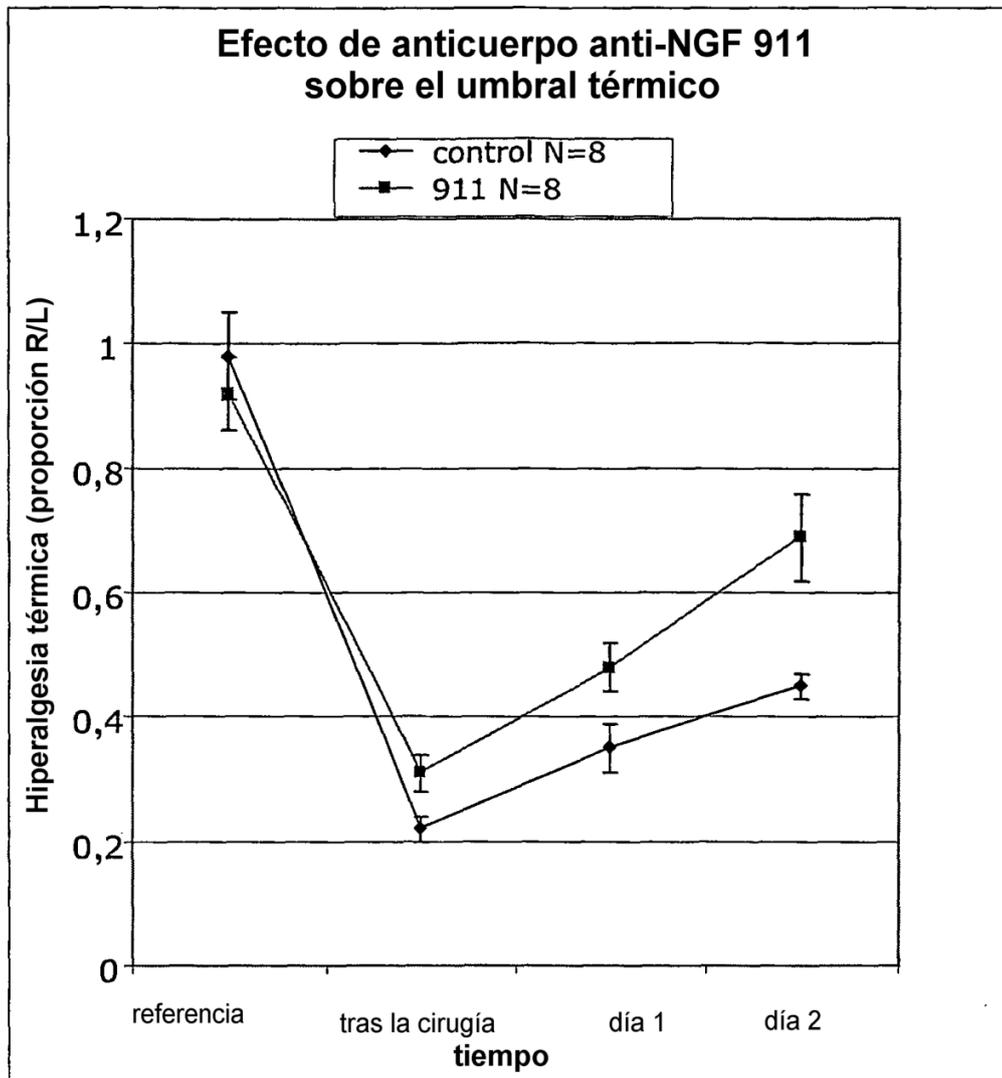


FIGURA 1

FIGURA 2



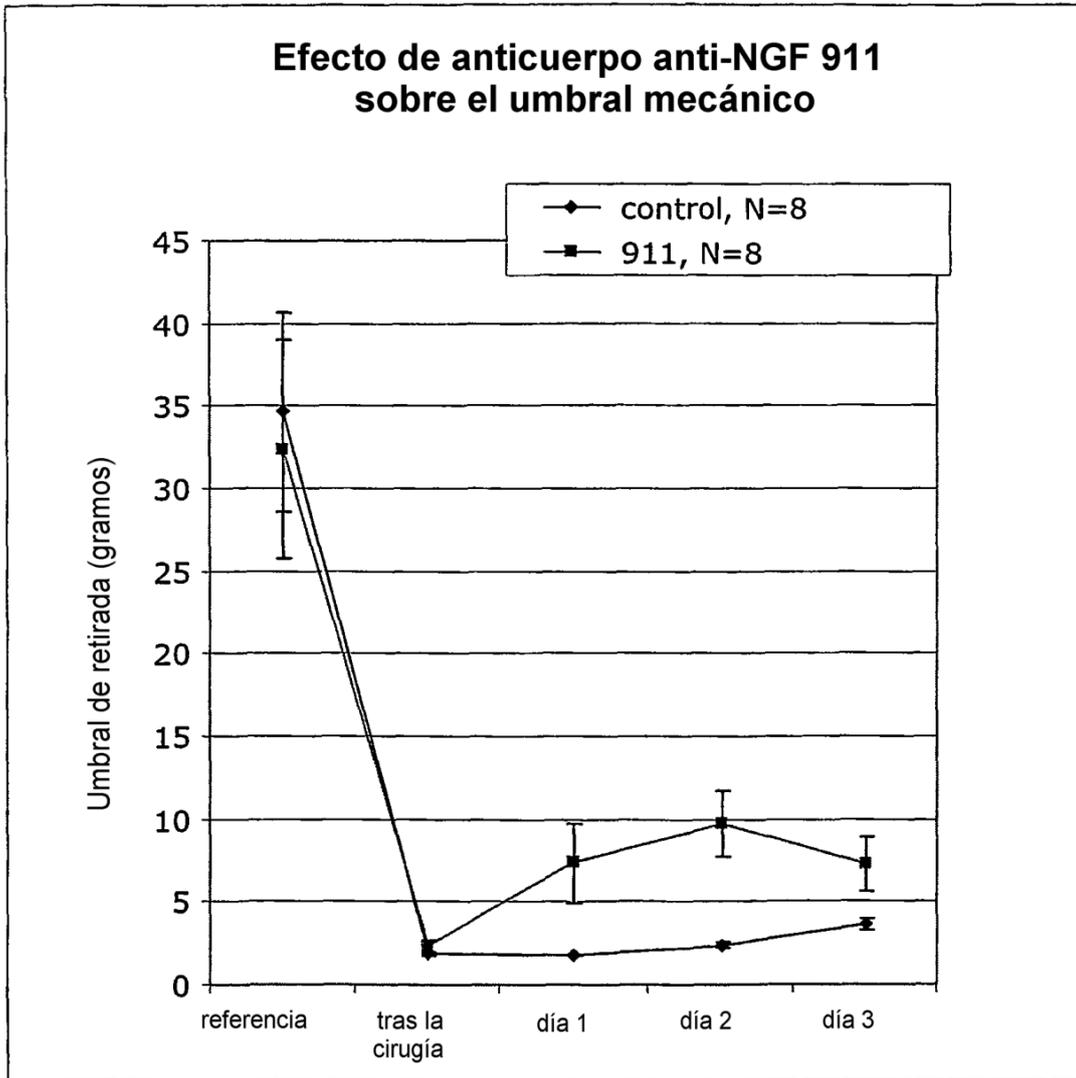


FIGURA 3

El anticuerpo anti-NGF humanizado E3 mejora el dolor post-quirúrgico

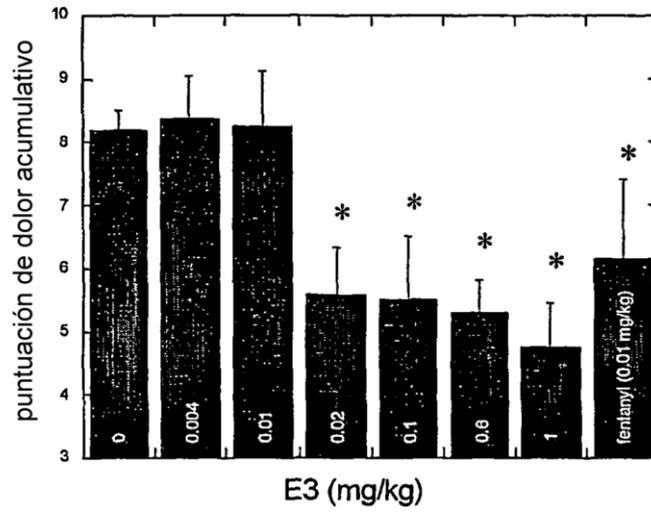


FIGURA 4

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

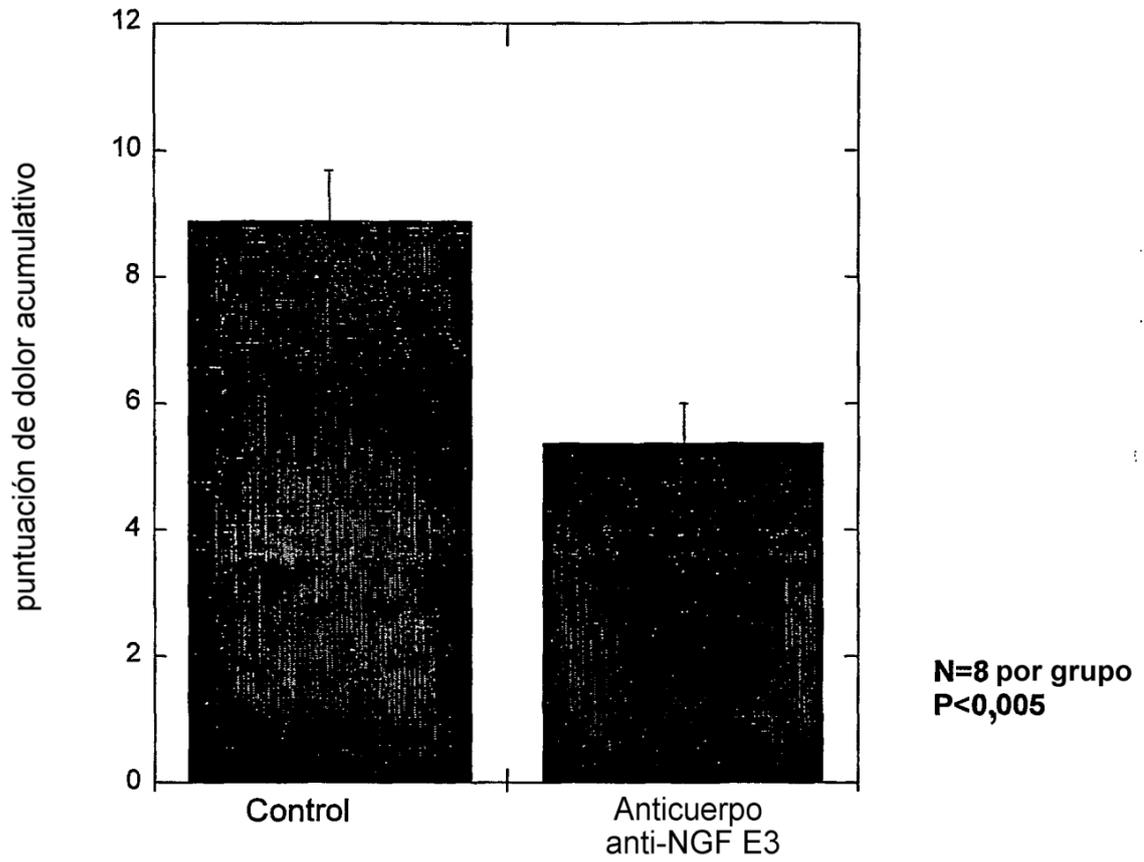


FIGURA 5

FIGURA 6

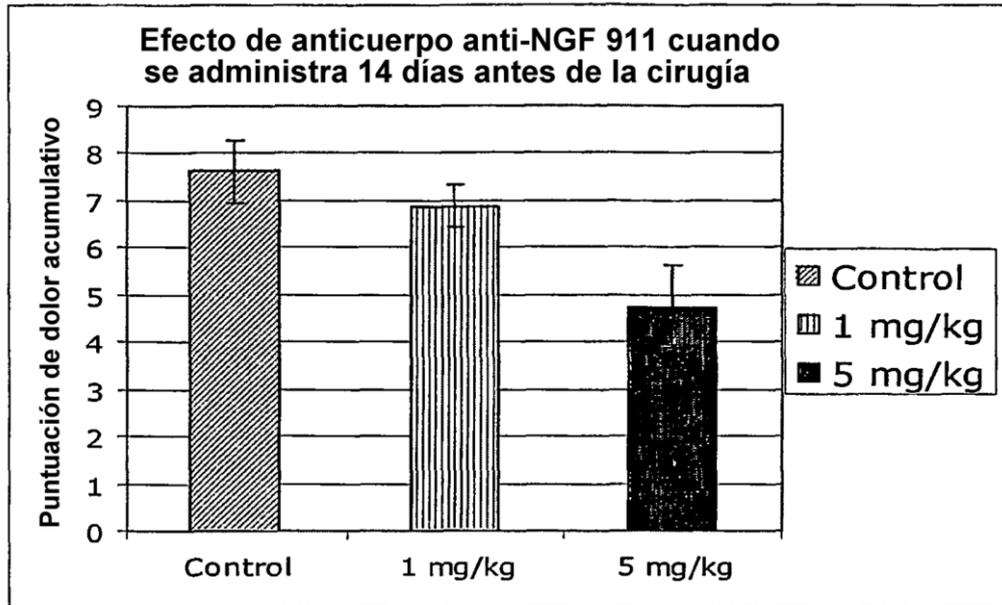
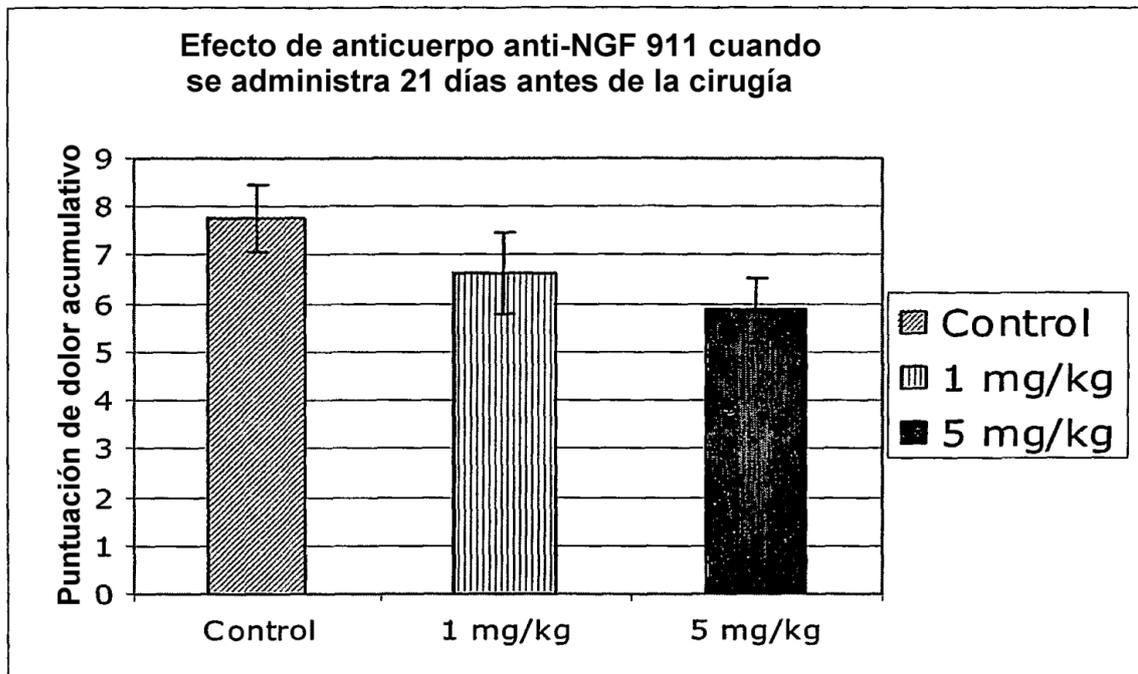


FIGURA 7



Proporción de heridas intactas tras la incisión y el tratamiento con solución salina, anticuerpo anti-NGF o ketorolaco

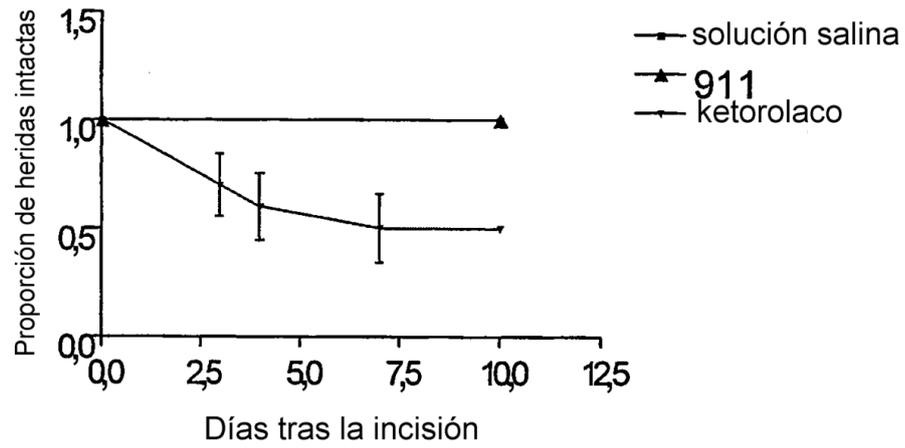
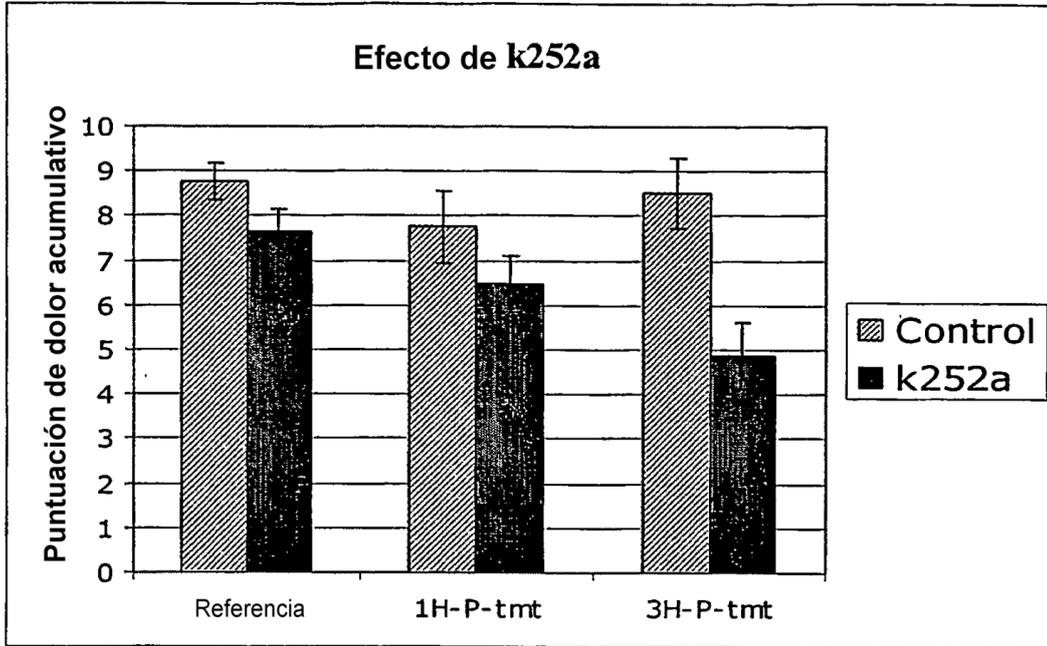


FIGURA 8

FIGURA 9



El efecto analgésico del tratamiento con anticuerpo anti-NGF es específico

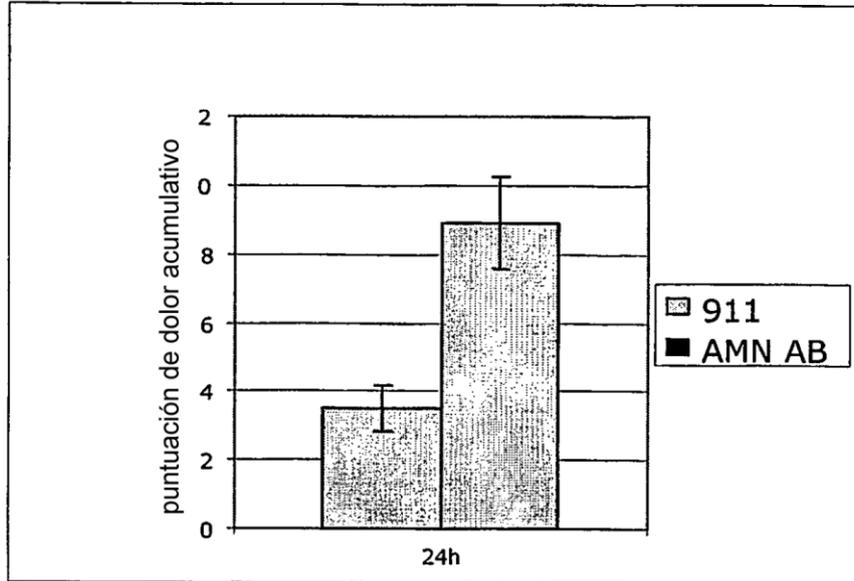


FIGURA 10