

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 514 319**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/22** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**A61P 25/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2010 E 10730827 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 2448970**

54 Título: **Anticuerpos contra el factor de crecimiento nervioso (NGF) con estabilidad in vivo mejorada**

30 Prioridad:

**04.05.2009 US 175228 P**

**21.07.2009 US 227251 P**

**01.09.2009 US 238813 P**

**16.10.2009 US 252314 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**28.10.2014**

73 Titular/es:

**ABBVIE RESEARCH B.V. (100.0%)**

**Meeuwenlaan 4**

**8011 BZ Zwolle, NL**

72 Inventor/es:

**POWELL, JOHN;**

**MAGINN, MARK;**

**CASSON, DUNCAN;**

**BEST, ANDREA;**

**HALL, JERRY A.;**

**LIU, WEI y**

**DUTTA, SANDEEP**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 514 319 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra el factor de crecimiento nervioso (NGF) con estabilidad *in vivo* mejorada

5 **Antecedentes de la invención**

**[0001]** El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una proteína secretada que fue descubierta hace 50 años como una molécula que promueve la supervivencia y diferenciación de las neuronas sensoriales y simpáticas. La cadena beta del NGF es responsable en exclusiva de la actividad de estimulación del crecimiento nervioso del NGF.  
 10 La cadena beta se homodimeriza y se incorpora en un complejo proteínico mayor. El NGF es un miembro de una familia de factores neurotróficos conocidos como neurotrofinas. El NGF se une con alta afinidad a un receptor de tropomiosina-cinasa conocido como TrkA. El NGF es también capaz de unirse a un receptor conocido como p75<sup>NTR</sup>, un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, que también interacciona con otras neurotrofinas. La estructura y función del NGF es revisada, por ejemplo, en Sofroniew, M.V. y col. (2001) Annu. Rev. Neurosci. 24: 1217-1281; Weismann, C. y de Vos, A.M. (2001) Cell. Mol. Life Sci. 58: 748-759; Fahnstock, M. (1991) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 165: 1-26.

**[0002]** Aunque el NGF se identificó originalmente por su capacidad para promover la supervivencia y diferenciación de las neuronas, existe una evidencia creciente que indica que estos efectos en el desarrollo son sólo un aspecto de la biología del NGF. En particular, el NGF se ha relacionado con la transmisión y el mantenimiento de dolor crónico o persistente. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración local y sistémica de NGF provoca hiperalgesia y alodinia (Lewin, G.R. y col. (1994) Eur. J. Neurosci. 6: 1903-1912). La infusión intravenosa de NGF en seres humanos produce una mialgia en todo el cuerpo mientras que la administración local evoca hiperalgesia y alodinia en el sitio de inyección además de los efectos sistémicos (Apfel, S.C. y col. (1998) Neurology 51: 695-702).  
 25 Además, en algunas formas de cáncer, el exceso de NGF facilita el crecimiento e infiltración de las fibras nerviosas con inducción de dolor por cáncer (Zhu, Z. y col. (1999) J. Clin. Oncol. 17: 241-228).

**[0003]** La intervención del NGF en el dolor crónico ha conducido a un interés considerable en los enfoques terapéuticos basados en la inhibición de los efectos del NGF (véase por ejemplo, Saragovi, H.U. y Gehring, K. (2000) Trends Pharmacol. Sci. 21: 93-98). Por ejemplo, se usó una forma soluble del receptor TrkA para bloquear la actividad del NGF, lo que según se demostró reduce significativamente la formación de neuromas, responsables de dolor neuropático, sin dañar los cuerpos celulares de las neuronas lesionadas (Kryger, G.S. y col. (2001) J. Hand Surg. (Am.) 26: 635-644).

**[0004]** Otro enfoque para neutralizar la actividad del NGF consiste en el uso de anticuerpos anti-NGF, anticuerpos de los se han descrito algunos ejemplos (véase por ejemplo, las publicaciones PCT nº WO-2001/78.698, WO-2001/64.247, WO-2002/096.458, WO-2004/032.870, WO-2005/061.540, WO-2006/131.951, WO-2006/110.883, la patente de EE.UU. nº 7.449.616; las publicaciones de EE.UU. nº US-2005/0.074.821, US-2008/0.033.157, US-2008/0.182.978 y US-2009/0.041.717). En modelos de animales de dolor neuropático (por ejemplo, ligadura del nervio raquídeo o del tronco del nervio) la inyección sistémica de anticuerpos de neutralización para NGF previene la alodinia y la hiperalgesia (Ramer, M.S. y Bisby, M.A. (1999) Eur. J. Neurosci. 11: 837-846; Ro, L.S. y col. (1999) Pain 79: 265-274). Además, el tratamiento con un anticuerpo anti-NGF de neutralización produce una reducción significativa del dolor en un modelo de dolor de cáncer murino (Sevcik, M.A. y col. (2005) Pain 115: 128-141).

**[0005]** El documento WO-2009/023.540 describe anticuerpos humanos para factor de crecimiento nervioso humano.

**[0006]** El documento WO-2006/131.951 describe moléculas que son capaces de inhibir la unión entre el NGF y el receptor TrkA como analgésico con efecto prolongado.

**[0007]** Así, a la vista de lo anterior, son deseables antagonistas de NGF adicionales.

**Resumen de la invención**

**[0008]** La presente invención proporciona anticuerpos anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones que muestran estabilidad *in vivo* mejorada. En particular, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende una mutación de región bisagra tal como se define en las reivindicaciones y en el que el anticuerpo muestra una larga semivida de eliminación terminal, por ejemplo una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de al

menos 15 días y normalmente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 días (o un intervalo de 15 días a 22 días), o en un intervalo de aproximadamente 15 días a 28 días (o en un intervalo de 15 días a 28 días), o en un intervalo de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 21 días a 28 días). Este anticuerpo anti-NGF estabilizado (anticuerpo estabilizado en bisagra) también muestra una semivida de eliminación terminal en ratas de al menos 8 días, normalmente en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 9 días (o en el intervalo de 8 a 9 días). En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF estabilizado (anticuerpo estabilizado en bisagra) puede mostrar una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días, o al menos 10 días, al menos 15 días, al menos 20 días, al menos 25 días, al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 10 a 40 días o en un intervalo de 15 a 30 días). En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF estabilizado (anticuerpo estabilizado en bisagra) puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

**[0009]** La mutación en la región constante de IgG4 es una mutación de región bisagra. La mutación de región bisagra en la región constante de IgG4 comprende la mutación de la serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de SEQ ID NO: 9 (que muestra la secuencia de aminoácidos natural de la región constante de IgG4 humana). En consecuencia, el anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) tiene una región constante de IgG4 humana, conteniendo dicha región constante de IgG4 humana una mutación de región bisagra que comprende la mutación de serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de SEQ ID NO: 9. La serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de SEQ ID NO: 9 se muta a prolina. La región constante de IgG4 humana del anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En la presente memoria descriptiva se describen otras mutaciones de estabilización de la IgG4.

**[0010]** Un anticuerpo anti-NGF preferido de la invención es el anticuerpo PG110, la secuencia de aminoácidos de cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO: 13 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 16. En consecuencia, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones que comprende una región constante de IgG4 humana, en la que el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. La memoria descriptiva describe un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en la que el anticuerpo comprende una cadena pesada codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14. La memoria descriptiva describe un anticuerpo anti-NGF que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de al menos 15 días (y normalmente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 días, o en un intervalo de 15 a 22 días, o en un intervalo de aproximadamente 15 días a 28 días, o en un intervalo de 15 a 28 días, o en un intervalo de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días o en un intervalo de 21 a 28 días), y/o tiene una semivida de eliminación terminal en un ser humano de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días, o en un intervalo de 10 a 40 días o en un intervalo de 15 a 30 días). De modo adicional o alternativo, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). Preferentemente, la cadena pesada es codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11. Preferentemente, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. Preferentemente, la cadena ligera es codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14.

**[0011]** En otra realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (que muestra la región variable de cadena pesada de PG110). En otra realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (que muestra la región variable de cadena ligera de PG110). En otra realización más, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En otra realización adicional, el anticuerpo anti-NGF compite por la unión a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

5

**[0012]** El anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente (en el que las SEQ ID NO: 3, 4 y 5 muestran las CDR de región variable de cadena pesada 1, 2 y 3, respectivamente, de PG110). El anticuerpo anti-NGF comprende también una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente (en el que las SEQ ID NO: 6, 7 y 8 muestran las CDR de región variable de cadena ligera 1, 2 y 3, respectivamente, de PG110). Así, el anticuerpo anti-NGF definido en las reivindicaciones comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente.

**[0013]** Preferentemente, el anticuerpo anti-NGF tiene una o más de las siguientes propiedades funcionales:

a) se une a NGF humano pero no se une a factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) humano, neurotrofina 3 (NT-3) humana o neurotrofina 4 (NT-4) humana;

b) se une a NGF humano o de rata con una  $K_D$  de 100 pM o menos;

c) inhibe la unión de NGF a TrkA o p75<sup>NTR</sup>;

25

d) inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1;

e) inhibe la supervivencia del ganglio de la raíz posterior de pollo dependiente de NGF;

f) inhibe el crecimiento de neuritas en células PC12 dependiente de NGF.

**[0014]** En otra realización, el anticuerpo anti-NGF de la invención no muestra un efecto de rebote cuando se administra a un sujeto. Por ejemplo, puede seleccionarse una cantidad de dosis y una frecuencia de dosificación para la administración del anticuerpo tal que el anticuerpo no muestre un efecto de rebote cuando se administra a un sujeto.

35

**[0015]** En otra realización, un anticuerpo anti-NGF de la invención es capaz de aliviar el dolor en un sujeto con larga duración, por ejemplo durante un periodo de al menos aproximadamente una semana, o al menos aproximadamente dos semanas, o al menos aproximadamente cuatro semanas, o al menos aproximadamente ocho semanas, o al menos aproximadamente doce semanas, o al menos aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas, o al menos de aproximadamente ocho semanas a aproximadamente doce semanas, o durante un periodo de al menos una semana, o al menos dos semanas, o al menos cuatro semanas, o al menos ocho semanas o al menos doce semanas o al menos de una a doce semanas, o al menos de cuatro a doce semanas, o al menos de ocho a doce semanas después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF al sujeto.

45

**[0016]** En una realización preferida en particular, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones que tiene las características ventajosas combinadas de una semivida de eliminación terminal extendida y una duración prolongada de alivio del dolor. En consecuencia, la invención también proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones que comprende una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende una mutación de región bisagra, en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un ser humano de al menos 10-30 días, o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 10-40 días o en un intervalo de 15-30 días), y en el que el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente una semana a aproximadamente doce semanas, o al menos de una semana a doce semanas, o al menos de aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas, o al menos de cuatro semanas a doce semanas, después de la administración de una dosis única del anticuerpo a un sujeto humano (o al menos una semana, o al menos dos semanas, o al menos cuatro semanas,

55

o al menos ocho semanas, o al menos doce semanas, o de una a doce semanas, o de cuatro a doce semanas, o de ocho a doce semanas, después de la administración de una dosis única del anticuerpo a un sujeto humano). La mutación de región bisagra comprende una mutación de serina a prolina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de SEQ ID NO: 9. La región constante de IgG4 humana  
 5 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En varias realizaciones, el anticuerpo puede mostrar una o más de las propiedades funcionales descritas en la presente memoria descriptiva. En una realización preferida, el anticuerpo compite por la unión a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

10

**[0017]** En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) tal como se define en las reivindicaciones que comprende una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y en el que el anticuerpo se une a NGF humano o de rata con una  $K_D$  de 100 pM o menos, inhibe la unión de NGF a TrkA o p75<sup>NTR</sup>  
 15 con una  $IC_{50}$  de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1 con una  $IC_{50}$  de 50 ng/ml o menos. Preferentemente, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días, o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 10-40 días o en un intervalo de 15-30 días). De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres  
 20 humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). El anticuerpo puede mostrar además una o más propiedades funcionales adicionales, tales como la unión al NGF humano pero no la unión al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) humano, la neurotrofina 3 (NT-3) humana o la neurotrofina 4 (NT-4) humana; la inhibición de la supervivencia del ganglio de la raíz posterior de pollo dependiente de NGF; y/o la inhibición del crecimiento de neuritas en células PC12 dependiente de NGF. Preferentemente, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente una semana a aproximadamente doce semanas, o al menos de aproximadamente cuatro  
 30 semanas a aproximadamente doce semanas, o al menos de aproximadamente ocho semanas a aproximadamente doce semanas, o al menos de una semana a doce semanas, o al menos de cuatro semanas a doce semanas o al menos de ocho semanas a doce semanas (o al menos una semana, o al menos cuatro semanas, o al menos ocho semanas, o al menos doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. El anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la  
 40 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o el anticuerpo compite por la unión a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

45

**[0018]** En varias realizaciones preferidas, la invención proporciona anticuerpos anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones que tienen las características siguientes:

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada  
 50 que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días. De  
 55 forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

**[0019]** Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días. De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

**[0020]** Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra tal como se define en las reivindicaciones, en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días. De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

**[0021]** Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra tal como se define en las reivindicaciones, en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días. De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

**[0022]** Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra tal como se define en las reivindicaciones, en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días. De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

**[0023]** Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra tal como se define en las reivindicaciones, en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días. De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

**[0024]** Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) tal como se define en las reivindicaciones, que comprende una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, en el que el anticuerpo se une a NGF humano o de rata con una  $K_D$  de 100 pM o menos, inhibe la unión de NGF a TrkA o p75<sup>NTR</sup> con una  $IC_{50}$  de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1 con una  $IC_{50}$  de 50 ng/ml o menos, y en el que el anticuerpo tiene

una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días. De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

5  
10  
15  
[0025] Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, en el que el anticuerpo se une a NGF humano o de rata con una  $K_D$  de 100 pM o menos, inhibe la unión de NGF a TrkA o  $p75^{NTR}$  con una  $IC_{50}$  de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1 con una  $IC_{50}$  de 50 ng/ml o menos.

20  
25  
[0026] Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, en el que el anticuerpo se une a NGF humano o de rata con una  $K_D$  de 100 pM o menos, inhibe la unión de NGF a TrkA o  $p75^{NTR}$  con una  $IC_{50}$  de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1 con una  $IC_{50}$  de 50 ng/ml o menos.

30  
35  
[0027] Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, que comprende una mutación de región bisagra tal como se define en las reivindicaciones, en el que el anticuerpo se une a NGF humano o de rata con una  $K_D$  de 100 pM o menos, inhibe la unión de NGF a TrkA o  $p75^{NTR}$  con una  $IC_{50}$  de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1 con una  $IC_{50}$  de 50 ng/ml o menos.

40  
45  
[0028] Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra tal como se define en las reivindicaciones, en el que el anticuerpo se une a NGF humano o de rata con una  $K_D$  de 100 pM o menos, inhibe la unión de NGF a TrkA o  $p75^{NTR}$  con una  $IC_{50}$  de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1 con una  $IC_{50}$  de 50 ng/ml o menos.

50  
55  
[0029] Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra tal como se define en las reivindicaciones, en el que el anticuerpo se une a NGF humano o de rata con una  $K_D$  de 100 pM o menos, inhibe la unión de NGF a TrkA o  $p75^{NTR}$  con una  $IC_{50}$  de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1 con una  $IC_{50}$  de 50 ng/ml o menos.

[0030] Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra tal como se define en las reivindicaciones, en el que el anticuerpo se une a NGF humano o de rata con una  $K_D$  de 100 pM o menos, inhibe la unión de NGF a TrkA o  $p75^{NTR}$  con una  $IC_{50}$  de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1 con una  $IC_{50}$  de 50 ng/ml o menos.

[0031] Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) tal como se define en las reivindicaciones que comprende una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende una mutación tal como se define en las reivindicaciones y en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días. De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede

mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

5

**[0032]** Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) tal como se define en las reivindicaciones que comprende una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende una mutación tal como se define en las reivindicaciones y en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de al menos 15 días. De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

10

**[0033]** En varias realizaciones, el anticuerpo anti-NGF de la invención puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, o un anticuerpo en el que se han eliminado los epítopos de linfocitos T potenciales.

15

**[0034]** En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones y un soporte farmacéuticamente aceptable.

20

**[0035]** La memoria descriptiva describe la atenuación o inhibición de una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de un anticuerpo anti-NGF de la invención. Entre los ejemplos no limitativos de las enfermedades y dolencias relacionadas con el NGF se incluyen dolor inflamatorio, dolor postoperatorio, dolor neuropático, dolor por fractura, dolor de articulación gotosa, neuralgia postherpética, dolor por cáncer, dolor por artrosis o artritis reumatoide, ciática, dolores asociados con crisis drepanocíticas, cefaleas, dismenorrea, endometriosis, dolor musculoesquelético, dolor lumbar crónico, fibromialgia, esguinces, dolor visceral, quistes ováricos, prostatitis, cistitis, cistitis intersticial, dolor por incisión, migraña, neuralgia del trigémino, dolor por quemaduras y/o heridas, dolor asociado con traumatismo, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor por metástasis óseas, dolor por VIH, eritromelalgia o dolor causado por pancreatitis o cálculos renales. Otros ejemplos de las enfermedades y dolencias relacionadas con el NGF incluyen melanoma maligno, síndrome de Sjogren y asma, por ejemplo asma incontrolado con hiperreactividad respiratoria grave, y tos intratable. Las enfermedades y dolencias preferidas en particular para el tratamiento según los procedimientos de la invención incluyen dolor inflamatorio (en particular dolor por artrosis o artritis reumatoide), dolor musculoesquelético (en particular dolor lumbar crónico), dolor neuropático (en particular neuropatía diabética), dolor por cáncer y dolor por metástasis óseas, cistitis intersticial/síndrome de la vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis y/o miomas uterinos y dolor postoperatorio.

25

**[0036]** El anticuerpo puede ser para administración, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea (por ejemplo, por medio de un bolígrafo de inyección o un implante subcutáneo), intramuscular o intraarticular, aunque en la presente memoria descriptiva se describen otras vías adecuadas. Preferentemente, el anticuerpo es para su administración en una dosis comprendida en un intervalo de 0,1 mg/kg a 3 mg/kg o en una dosis comprendida en un intervalo de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg. El anticuerpo puede ser para administración, por ejemplo, en una dosis comprendida en un intervalo de aproximadamente 3 µg/kg a aproximadamente 3.000 µg/kg, con dosificaciones preferidas que incluyen 100 µg/kg o 300 µg/kg. En otras realizaciones, el anticuerpo es para su administración en una dosis comprendida en un intervalo de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg, o en un intervalo de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg, o en un intervalo de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 30 mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 20 mg/kg o en un intervalo de 1 mg/kg a 10 mg/kg, aunque en la presente memoria descriptiva se describen otras dosificaciones e intervalos de dosis adecuados. Además, puede usarse una formulación de dosis fija del anticuerpo.

30

35

**[0037]** El anticuerpo puede ser para administración en solitario o en combinación con uno o más agentes farmacéuticos adicionales. Por ejemplo, en combinación con el anticuerpo anti-NGF de la invención puede administrarse un segundo agente farmacéutico, tal como un AINE, un analgésico (por ejemplo, un analgésico opioide), un anestésico local, un bloqueo nervioso, un bloqueo con fenol, un anticuerpo terapéutico, un anticonvulsivo, un antidepresivo, capsaicina tópica, un esteroide o un agente antivírico. Los segundos agentes farmacéuticos preferidos en particular para un tratamiento en combinación con un anticuerpo de la invención incluyen analgésicos opioides, tales como la morfina. Otros segundos agentes farmacéuticos preferidos para un

40

45

50



tratamiento en combinación incluyen inhibidores de TrkA e inhibidores de la proteína-cinasa C (PKC).

**[0038]** En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF para su uso en un procedimiento de atenuación o inhibición del dolor en un sujeto, en el que el anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) es tal como se define en las reivindicaciones y en el que el anticuerpo alivia el dolor en el sujeto durante un periodo de al menos cuatro a doce semanas (o durante al menos de una a doce semanas, o durante al menos de ocho a doce semanas, o durante cuatro a doce semanas, o durante una a doce semanas, o durante ocho a doce semanas, o durante al menos una semana, o durante al menos cuatro semanas, o durante al menos ocho semanas, o durante al menos doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. El anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Preferentemente, el dolor se selecciona entre el grupo que consiste en dolor por artrosis, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor por metástasis óseas, cistitis intersticial, síndrome de la vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con miomas uterinos y dolor postoperatorio. Preferentemente, el anticuerpo anti-NGF es para su administración en una dosis comprendida en un intervalo de 0,1 a 3 mg/kg o en una dosis comprendida en un intervalo de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg. Preferentemente, el anticuerpo es para su administración por vía intravenosa o subcutánea. Preferentemente, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un ser humano de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días, o en un intervalo de 10 a 40 días o en un intervalo de 15 a 30 días).

**[0039]** La memoria descriptiva describe la atenuación o inhibición de una enfermedad o dolencia relacionada con el factor de crecimiento nervioso (NGF) en un sujeto de manera que se evita un efecto de rebote en el sujeto, usando un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende una mutación de región bisagra, y en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un ser humano de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días, o en un intervalo de 10 a 40 días o en un intervalo de 15 a 30 días), y en el que el anticuerpo se administra en una dosificación y en una frecuencia tal que se evita un efecto de rebote en el sujeto. De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). Preferentemente, la región constante de IgG4 humana comprende una mutación en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de SEQ ID NO: 9. Preferentemente, la serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de SEQ ID NO: 9 se muta a prolina. Preferentemente, la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Preferentemente, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Preferentemente, el anticuerpo compite por la unión a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Preferentemente, la enfermedad o dolencia relacionada con el NGF es dolor seleccionado entre el grupo que consiste en dolor por artrosis, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor por metástasis óseas, cistitis intersticial, síndrome de la vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con miomas uterinos y dolor postoperatorio. Preferentemente, el anticuerpo anti-NGF se administra en una dosis comprendida en un intervalo de 0,1 a 3 mg/kg o en un intervalo de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg. Preferentemente, el anticuerpo se administra por vía intravenosa o subcutánea.

**[0040]** En otro aspecto, la invención proporciona para el uso del anticuerpo anti-NGF de la invención tal como

se define en las reivindicaciones para la fabricación de un medicamento destinado a atenuar o inhibir una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF en un sujeto, en el que la enfermedad o dolencia relacionada con el NGF es dolor. Preferentemente, el dolor se selecciona entre el grupo que consiste en dolor por artrosis, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor por metástasis óseas, cistitis intersticial, síndrome de la vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con miomas uterinos y dolor postoperatorio.

**[0041]** La memoria descriptiva describe el uso del anticuerpo anti-NGF de la invención para la fabricación de un medicamento destinado a su uso para atenuar o inhibir el dolor en un sujeto, de manera que el dolor es atenuado o inhibido en el sujeto durante un periodo de al menos aproximadamente una semana a aproximadamente doce semanas, o al menos de aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas, o al menos de aproximadamente ocho semanas a aproximadamente doce semanas (o durante un periodo de una a doce semanas, o de cuatro a doce semanas, o de ocho a doce semanas, o al menos una semana, o al menos dos semanas, o al menos cuatro semanas, o al menos ocho semanas, o al menos doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto.

**[0042]** La memoria descriptiva describe el uso del anticuerpo anti-NGF de la invención para la fabricación de un medicamento destinado a su uso para atenuar o inhibir una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF en un sujeto de manera que se evita un efecto de rebote en el sujeto. En particular, el anticuerpo se administra en una dosificación y en una frecuencia tales que se evita un efecto de rebote en el sujeto.

**[0043]** En otros aspectos adicionales, la invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesadas y/o las cadenas ligeras de los anticuerpos anti-NGF de la invención, así como vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dichos vectores, células hospedadoras que comprenden dichos vectores y procedimientos para expresar los anticuerpos anti-NGF usando las células hospedadoras de la invención, todo tal como se define en las reivindicaciones.

**[0044]** La memoria descriptiva describe la atenuación o inhibición de una enfermedad o dolencia relacionada con el factor de crecimiento nervioso (NGF) en un sujeto de manera que se evita un efecto de rebote en el sujeto. El procedimiento comprende la administración al sujeto de un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende una mutación (preferentemente una mutación de región bisagra) y en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de al menos 15 días, más preferentemente de al menos 21 días, y en el que el anticuerpo se administra en una dosificación y en una frecuencia tales que se evita un efecto de rebote en el sujeto. En otra realización, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 22 días (o 15-22 días), o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 28 días (o 15-28 días), o en un intervalo de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días (o 21-28 días). En otra realización, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en una rata de al menos 8 días. En otra realización más, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días, o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días, o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días, o en un intervalo de 10-40 días o en un intervalo de 15-30 días). De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). Entre las mutaciones preferidas se incluyen las descritas anteriormente. Entre los anticuerpos preferidos se incluyen aquellos que tienen las secuencias y/o las propiedades funcionales adicionales tal como se describe anteriormente. Entre los ejemplos no limitativos de las enfermedades y dolencias relacionadas con el NGF se incluyen los expuestos anteriormente.

**[0045]** La memoria descriptiva describe el uso del anticuerpo anti-NGF de la invención para la fabricación de un medicamento destinado a su uso para atenuar o inhibir una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF en un sujeto de manera que se evita un efecto de rebote en el sujeto.

**[0046]** En las reivindicaciones se definen también kits que comprenden un anticuerpo anti-NGF de la invención. Por ejemplo, un kit puede comprender anticuerpo anti-NGF e instrucciones para el uso del anticuerpo en el tratamiento de una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF.

**Breve descripción de los dibujos**

[0047]

5 La Figura 1 es un gráfico que muestra la unión de PG110 a factor de crecimiento nervioso (NGF) humano pero no a factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) humano, neurotrofina 3 (NT-3) humana o neurotrofina 4 (NT-4) humana, según se ha determinado mediante ELISA.

La Figura 2A es un gráfico que muestra la inhibición de la unión de NGF al receptor TrkA por el anticuerpo PG110,  
10 según se ha determinado mediante un experimento de unión de ligando radiomarcado.

La Figura 2B es un gráfico que muestra la inhibición de la unión de NGF al receptor p75<sup>NTR</sup> por el anticuerpo PG110, según se ha determinado mediante un experimento de unión de ligando radiomarcado.

15 La Figura 3A es un gráfico que muestra el efecto inhibitor del anticuerpo PG110 en la proliferación de células TF-1 estimulada por NGF humano.

La Figura 3B es un gráfico que muestra el efecto inhibitor del anticuerpo PG110 en la proliferación de células TF-1  
20 estimulada por NGF de rata.

La Figura 3C es un gráfico que muestra el efecto inhibitor del anticuerpo PG110 en la proliferación de células TF-1 estimulada por NGF de ratón.

La Figura 4 es un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con anticuerpo PG110 en lesiones cutáneas en ratas.  
25

**Descripción detallada de la invención**

[0048] La invención se refiere a anticuerpos del anti-factor de crecimiento nervioso tal como se define en las reivindicaciones que muestran estabilidad *in vivo* mejorada, como se demuestra, por ejemplo, por una semivida de  
30 eliminación terminal inesperadamente larga en monos cynomolgus. Los anticuerpos de la invención incluyen una modificación de la región constante de IgG4 humana del anticuerpo, mediante introducción de una mutación en la región bisagra de la región constante IgG4.

[0049] Para que la presente invención pueda comprenderse con más facilidad, primero se definen algunos  
35 términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

**I. Definiciones**

[0050] Los términos "factor de crecimiento nervioso" o "NGF" se usan indistintamente en la presente memoria  
40 descriptiva e incluyen variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, un anticuerpo específico para NGF humano puede, en determinados casos, interaccionar con NGF de especies distintas a la humana. En otras realizaciones, un anticuerpo específico para NGF humano puede ser completamente específico para el NGF humano y no puede mostrar reactividad entre especies ni otros tipos de reactividad cruzada. El término "NGF humano" se refiere a NGF de secuencia humana, de manera que comprende la secuencia de aminoácidos de  
45 cadena de NGF-β humano, cuya forma precursora tiene número de acceso de Genbank NP\_002497, codificado por la secuencia de nucleótidos de número de acceso de Genbank M\_002506. La secuencia de cadena de NGF-β humano puede diferir del NGF-β humano de número de acceso de Genbank NP\_002497, por ejemplo, al tener sustituciones conservadas o sustituciones en regiones no conservadas en las que el NGF-β humano tiene sustancialmente la misma función biológica que el NGF-β humano de número de acceso de Genbank NP\_002497.  
50 El término "NGF de rata" se refiere a NGF de secuencia de rata, de manera que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena NGF-β de rata, cuya forma precursora tiene número de acceso de Genbank XP\_227525, codificado por la secuencia de nucleótidos de número de acceso de Genbank XP\_227525. El término "NGF de ratón" se refiere a NGF de secuencia de rata, de manera que comprende la secuencia de aminoácidos de cadena NGF-β de ratón, cuya forma precursora tiene número de acceso de Genbank NP\_038637, codificado por la  
55 secuencia de nucleótidos de número de acceso de Genbank NM\_013609.

[0051] El término "receptor TrkA", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un receptor de NGF también conocido en la técnica como receptor de tropomiosina-cinasa A y receptor neurotrófico de tirosina-cinasa de tipo 1 (NTRK1). Entre las secuencias de ejemplo no limitativas para receptor TrkA humano se

incluyen las secuencias de aminoácidos de número de acceso de Genbank NP\_001012331 (isoforma 1), NP\_002520 (isoforma 2) y NP\_001007793 (isoforma 3).

5 **[0052]** El término "receptor p75<sup>NTR</sup>", tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un receptor de neurotrofina, con un peso molecular de aproximadamente 75 kDa, que se une a NGF y otras neurotrofinas, un receptor que se describe, por ejemplo, en Bothwell, M. (1996) Science 272: 506-507. Una secuencia de ejemplo no limitativa para receptor p75<sup>NTR</sup> humano es la secuencia de aminoácidos de número de acceso de Genbank NP\_002498, codificada por la secuencia de nucleótidos de número de acceso de Genbank NM\_002507.

10

**[0053]** El término "semivida de eliminación terminal", tal como se usa en la presente memoria descriptiva en relación con los anticuerpos anti-NGF, se refiere al periodo de tiempo necesario para que la concentración del anticuerpo, según se mide en el suero de un sujeto al que se ha administrado el anticuerpo, se reduzca a la mitad una vez que la absorción y la redistribución del anticuerpo se han completado. Cuando se usa un grupo de sujetos, 15 puede usarse la media geométrica de la semivida de eliminación terminal en los sujetos como medida de la semivida de eliminación terminal del anticuerpo.

**[0054]** El término "semivida farmacológica", tal como se usa en la presente memoria descriptiva en relación con los anticuerpos anti-NGF, se refiere al periodo de tiempo medio para mantener el efecto del fármaco *in vivo* (TMR para efecto del fármaco). Puede calcularse como la relación entre el área de la curva de efecto-tiempo corregida según los valores de referencia del primer momento (ABCEM) y el efecto del fármaco acumulado corregido según los valores de referencia con el tiempo (área bajo la curva efecto-tiempo, ABCE), usando la fórmula siguiente:

$$\text{Semivida farmacológica} = \frac{\text{ABCEM}}{\text{ABCE}} = \frac{\int E(t)dt}{\int E(t)dt}$$

25

Quando se usa un grupo de sujetos, puede usarse la media geométrica de la semivida farmacológica en los sujetos como medida de la semivida farmacológica del anticuerpo.

30 **[0055]** El término "mutación de región bisagra", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una mutación, tal como una mutación, sustitución, adición o deleción puntual, en la región bisagra de un dominio constante de inmunoglobulina.

35 **[0056]** El término "inhibición" tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a cualquier reducción estadísticamente significativa en la actividad biológica, incluyendo el bloqueo completo de la actividad. Por ejemplo, "inhibición" puede referirse a una disminución de aproximadamente el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100% en la actividad biológica.

40 **[0057]** El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina", tal como se usa indistintamente en la presente memoria descriptiva, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "parte de unión a antígeno") o cadenas únicas de los mismos que conservan la estabilidad *in vivo* mejorada descrita en la presente memoria descriptiva. Un "anticuerpo" comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está formada por una región variable de cadena pesada (abreviado en la presente memoria descriptiva como V<sub>H</sub>) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está formada por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está formada 45 por una región variable de cadena ligera (abreviado en la presente memoria descriptiva como V<sub>L</sub>) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está formada por un dominio, CL. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo terminal amino al 50 extremo terminal carboxi en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos del hospedador, lo que incluye diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

55

**[0058]** El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a un

- anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos con la salvedad de las posibles mutaciones de ocurrencia natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones convencionales de anticuerpos (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando cualquier técnica reconocida anterior, por ejemplo, un procedimiento de hibridoma, tal como se describe en Kohler y col. (1975) *Nature*, 256: 495, un animal transgénico, tal como se ha descrito, por ejemplo, (véase por ejemplo, Lonberg, y col. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. nº 4.816.567) o uso de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando la técnica descrita, por ejemplo, en Clarkson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991). Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados y pueden ocurrir naturalmente o producirse de forma recombinante.
- 15 **[0059]** El término "anticuerpo recombinante" se refiere a anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina (por ejemplo, genes de inmunoglobulina humana) o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformados para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de una transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos combinatorios recombinantes (por ejemplo, que contengan secuencias de anticuerpos humanos) usando expresión de fagos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina (por ejemplo, genes de inmunoglobulina humana) a otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos recombinantes pueden tener regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana. En algunas realizaciones, sin embargo, 25 dichos anticuerpos recombinantes humanos pueden someterse a mutagenia *in vitro* y así las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.
- 30 **[0060]** El término anticuerpo o "inmunoglobulina quimérica" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables proceden de una primera especie y cuyas regiones constantes proceden de una segunda especie. Los anticuerpos o inmunoglobulinas quiméricas pueden construirse, por ejemplo por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulinas pertenecientes a diferentes especies.
- 35 **[0061]** El término "anticuerpo humanizado" o "inmunoglobulina humanizada" se refiere a un anticuerpo o inmunoglobulina que incluye al menos una cadena de anticuerpos o inmunoglobulinas humanizados (es decir, al menos una cadena pesada o ligera humanizada). El término "cadena de inmunoglobulinas humanizadas" o "cadena de anticuerpos humanizados" (es decir, una "cadena ligera de inmunoglobulinas humanizadas" o "una cadena pesada de inmunoglobulinas humanizadas") se refiere a una cadena de inmunoglobulinas o anticuerpos (es decir, 40 una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región marco variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humanos y regiones determinantes de complementariedad (CDR) (por ejemplo, al menos una CDR, preferentemente dos CDR, más preferentemente tres CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humanos, e incluye además regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o una parte de la misma, en el caso de una cadena ligera, y 45 preferentemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). El término "región variable humanizada" (por ejemplo, "región variable humanizada de cadena ligera" o "región variable humanizada de cadena pesada") se refiere a una región variable que incluye una región marco variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humanos y regiones determinantes de complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humanos.
- 50 **[0062]** El término "anticuerpo humano", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en los que tanto las regiones marco como las CDR proceden de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana tal como se describe, por ejemplo, en Kabat y col. (véase Kabat, y col. (1991) *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication nº 91-3242). Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también procede de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagenia aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", tal como se usa en la presente memoria

descriptiva, no pretende incluir anticuerpos en los que se hayan injertado secuencias de CDR procedentes de la línea germinal de otras especies de mamíferos, por ejemplo un ratón, en secuencias marco humanas.

- [0063]** Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a NGF está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de NGF). Además, un anticuerpo aislado está en general sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o productos químicos.
- [0064]** Tal como se usan en la presente memoria descriptiva, los términos "unión específica", "se une específicamente a", "unión selectiva" y "se une selectivamente a" significan que un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo muestra una afinidad apreciable por un antígeno o epítipo en particular y, generalmente, no muestra una reactividad cruzada significativa con otros antígenos y epítopos. Unión preferida o "apreciable" incluye la unión con una afinidad de al menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$   $M^{-1}$  o  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Son más preferidas las afinidades superiores a que  $10^7$   $M^{-1}$ , preferentemente superiores a  $10^8$   $M^{-1}$ . Los valores intermedios de los expuestos en la presente memoria descriptiva también pretenden incluirse dentro del alcance de la presente invención y una afinidad de unión preferida puede indicarse como un intervalo de afinidades, por ejemplo, de  $10^6$  a  $10^{10}$   $M^{-1}$ , preferentemente de  $10^7$  a  $10^{10}$   $M^{-1}$ , más preferentemente de  $10^8$  a  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Un anticuerpo que "no muestra reactividad cruzada significativa" es aquél que no se unirá apreciablemente con una entidad no deseable (por ejemplo, una entidad proteínica no deseable). La unión específica o selectiva puede determinarse según cualquier medio reconocido en la técnica para determinar dicha unión, lo que incluye, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva.
- [0065]** El término " $K_D$ " tal como se usa en la presente memoria descriptiva, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno o a la afinidad de un anticuerpo por un antígeno. En una realización, el anticuerpo según la presente invención se une a un antígeno (por ejemplo, NGF) con una afinidad ( $K_D$ ) de aproximadamente 100 pM o menos (es decir, o mejor) (por ejemplo, aproximadamente 90 pM o aproximadamente 80 pM o aproximadamente 70 pM o aproximadamente 60 pM o aproximadamente 50 pM o aproximadamente 40 pM o aproximadamente 30 pM), según se mide usando un ensayo de resonancia de plasmones superficiales o un ensayo de unión a células. En una realización preferida, el anticuerpo se une a NGF con una afinidad ( $K_D$ ) comprendida en un intervalo de aproximadamente 25-35 pM.
- [0066]** El término " $K_{aso}$ ", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, pretende referirse a la constante de velocidad de asociación para la asociación de un anticuerpo en el complejo anticuerpo/antígeno.
- [0067]** El término " $K_{diso}$ ", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.
- [0068]** El término " $IC_{50}$ ", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a la concentración de un anticuerpo que inhibe una respuesta, ya sea en un ensayo *in vitro* o un ensayo *in vivo*, hasta un nivel que es el 50% de la respuesta inhibitoria máxima, es decir, a medio camino entre la respuesta inhibitoria máxima y la respuesta sin tratar.
- [0069]** El término "molécula de ácido nucleico", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario. El término "molécula de ácido nucleico aislada", tal como se usa en la presente memoria descriptiva en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o partes de anticuerpos (por ejemplo,  $V_H$ ,  $V_L$ , CDR3) que se unen a NGF, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o la parte de anticuerpo están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos que se unen a antígenos distintos de NGF, de manera que otras secuencias pueden flanquear naturalmente al ácido nucleico en ADN genómico humano.
- [0070]** El término "ligado operativamente" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos dispuesta en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una secuencia de señal o secuencia guía secretora está ligado operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está ligado operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está ligado operativamente a una secuencia de codificación si está colocado de manera que facilite la traducción. Generalmente, "ligado operativamente" significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas, y, en el caso de una guía secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser

contiguos. La ligadura se consigue mediante conexión en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o conectores de oligonucleótido sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional. Un ácido nucleico está "ligado operativamente" cuando se dispone en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o potenciador está ligado operativamente con una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia. Con respecto a las secuencias reguladoras de transcripción, ligado operativamente significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones de codificación de proteínas, contiguas y en marco de lectura. Para secuencias de cambio, ligado operativamente indica que las secuencias son capaces de realizar recombinación de cambios.

10 **[0071]** El término "vector", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico a aquél al que está ligada. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que son introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episomiales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomiales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y por consiguiente se replican junto con el genoma del hospedador. Por otra parte, algunos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están ligados operativamente. Dichos vectores se refieren en la presente memoria descriptiva como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente. Sin embargo, la invención pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados defectuosos para replicación), que sirven para funciones equivalentes.

25 **[0072]** El término "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), tal como se usa en la presente memoria descriptiva, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos pretenden referirse no sólo a la célula del sujeto en particular sino a la progenie de dicha célula. Dado que pueden producirse ciertas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede, en la práctica, no ser idéntica a la célula progenitora, pero se incluye dentro del alcance del término "célula hospedadora" tal como se usa en la presente memoria descriptiva.

35 **[0073]** Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento, tal como se usan en la presente memoria descriptiva, se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en la presente memoria descriptiva. Los usos para "tratamiento" emplean la administración, a un sujeto, de un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, un sujeto que tiene una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF, con el fin de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o dolencia.

40 **[0074]** El término "enfermedad o dolencia relacionada con el NGF", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a enfermedades y dolencias en las que la actividad de NGF está implicada con, o asociada con, o media o promueve uno o más síntomas de la enfermedad o dolencia.

45 **[0075]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. En una realización en particular, el sujeto es un ser humano. El término "animal no humano" incluye a todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

50 **[0076]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "efecto de rebote" se refiere a la reducción en la eficacia de los agentes de secuestro de NGF, tales como un anticuerpo anti-NGF, que tiene lugar en un sujeto después de un periodo inicial de eficacia tras una administración única o repetida. Por ejemplo, el tratamiento con un anticuerpo anti-NGF puede aliviar inicialmente el dolor, por ejemplo debido a inflamación o lesión nerviosa u otra etiología, lo que a continuación se sigue de un periodo de disminución de la eficacia analgésica en el que el dolor termina por convertirse aproximadamente en tan intenso o más que antes del tratamiento. En otro ejemplo, un anticuerpo anti-NGF puede mostrar una eficacia inicial en un sujeto durante un periodo de tiempo después de la administración única o repetida, por ejemplo un periodo de una semana después de la administración (por ejemplo, los días 1-7 después de la administración), lo que a continuación se sigue de un periodo de reducción de la eficacia, por ejemplo durante un periodo de 1-2 semanas después de la administración (por ejemplo, en los días 7-14 después de la administración). Este periodo de "rebote" puede seguirse de un periodo de recuperación de

la eficacia del anticuerpo anti-NGF. Por ejemplo, puede existir un perfil bifásico de la analgesia después de la administración única o repetida de un anticuerpo anti-NGF, con un periodo intermedio de reducción de la eficacia o incluso sensación de dolor exagerada. Este efecto de rebote puede valorarse, por ejemplo, en estudios de dolor clínico, modelos experimentales de dolor y/u otros modelos de eficacia anti-NGF. Este efecto de rebote puede asociarse, por ejemplo, con aumento del dolor en el sujeto y/o mayores episodios adversos (tales como sensaciones anormales, comprendidas entre alodinia y disestesia, parestesia y hiperestesia o hipoestesia) durante el periodo de rebote. Aunque sin pretender estar limitado por el mecanismo, el efecto de rebote puede ser originado por una expresión alterada del NGF, una expresión o señalización alterada del receptor TrkA o p75 o cualquier otro mecanismo que produzca una reducción transitoria de la eficacia después de la administración única o repetida de un anti-NGF tras un periodo inicial de eficacia.

**[0077]** En las subsecciones siguientes se describen más en detalle diversos aspectos de la invención.

## **II. Anticuerpos de la invención**

15

### A. Estabilidad *in vivo* mejorada

**[0078]** Los anticuerpos anti-NGF de la invención se caracterizan por tener estabilidad *in vivo* mejorada, tal como evidencia la larga semivida de eliminación terminal observada *in vivo*. Aunque sin pretender estar limitado por el mecanismo, se cree que la semivida de eliminación terminal extendida del anticuerpo procede de una reducción en la velocidad de aclaramiento del anticuerpo más que de un aumento en el volumen de distribución del anticuerpo. Los anticuerpos de la invención comprenden una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra. La mutación de región bisagra comprende mutación de serina en la posición de aminoácido 108 de SEQ ID NO: 9 (en la que SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de la región constante natural de IgG4 humana). La mutación de región bisagra comprende mutación de la serina en la posición de aminoácido 108 de SEQ ID NO: 9 a prolina. La región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

**[0079]** Un anticuerpo anti-NGF de la invención muestra una semivida de eliminación terminal inesperadamente larga, tal como una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de al menos 15 días y normalmente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 días (o en un intervalo de 15-22 días), o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 15-28 días) o en un intervalo de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 21-28 días). Este anticuerpo anti-NGF estabilizado también muestra una semivida de eliminación terminal en ratas de al menos 8 días, normalmente en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 9 días (o en un intervalo de 8-9 días). Tal como se describe en detalle en el Ejemplo 4, PG110, un anticuerpo anti-NGF de la invención, muestra una semivida de eliminación terminal media en monos cynomolgus de al menos 15 días y normalmente más prolongada. Por ejemplo, en un estudio con monos cynomolgus, se observó una semivida de eliminación terminal media en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 días. En otro estudio con monos cynomolgus, se observó una semivida de eliminación terminal media en un intervalo de aproximadamente 21 a aproximadamente 28 días. Además, PG110 muestra una semivida de eliminación terminal media en ratas de aproximadamente 8 a aproximadamente 9 días. Además, como se conoce en la técnica que la semivida de eliminación terminal de IgG en seres humanos es aproximadamente el doble que en los monos, se ha predicho que los anticuerpos anti-NGF de la invención, tales como PG110, tendrán una semivida de eliminación terminal en seres humanos de al menos 10-30 días, o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o más preferentemente al menos 30 días o al menos 40 días, o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días (o en el intervalo de 10-40 días) o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 15-30 días). De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). Tal como se describe adicionalmente en el Ejemplo 8, se ha mostrado que un anticuerpo anti-NGF de la invención tiene una semivida farmacológica media en seres humanos en los intervalos mencionados anteriormente.

55

**[0080]** La semivida de eliminación terminal para PG110 en monos cynomolgus es considerablemente más larga que la semivida que se ha comunicado en la técnica para otros anticuerpos IgG4 en monos cynomolgus. Por ejemplo, se ha comunicado una semivida de aproximadamente 40-90 horas (aproximadamente 1,6-3,8 días) en monos cynomolgus para CDP571, un anticuerpo anti-TNF IgG4 (véase Stephens, S. y col. (1995) *Immunol.* 85: 668-



674). Análogamente, se ha comunicado una semivida de aproximadamente 3 días en monos cynomolgus para natalizumab, un anticuerpo antiintegrina IgG4 (véase Refusal CHMP Assessment Report for Natalizumab, European Medicines Agency, Londres, 15 de noviembre de 2007, Doc. Ref. EMEA/CHMP/8203/2008).

- 5 **[0081]** La mutación de región bisagra usada en la invención es una mutación de serina a prolina en la posición 108 en SEQ ID NO: 9. Esta mutación ha sido descrita anteriormente en la técnica (véase Angal, S. y col. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-108) y se ha comunicado que elimina la heterogeneidad de moléculas IgG4, en particular la formación de semianticuerpos que contienen una única cadena pesada y una única cadena ligera. En consecuencia, en la presente memoria descriptiva se describe también la sustitución de un aminoácido distinto de la prolina en la posición 108 de SEQ ID NO: 9, en el que la sustitución consigue el mismo efecto que la mutación Ser a Pro en la eliminación de la heterogeneidad de la molécula IgG4 (por ejemplo, la formación de semianticuerpos). La capacidad de una mutación en la posición 108 para eliminar la heterogeneidad de la molécula IgG4 puede ser valorada tal como se describe en Angal y col. (1993), véase más arriba.
- 10
- 15 **[0082]** Además de, o de forma alternativa a, la modificación en la posición 108 de SEQ ID NO: 9, se han descrito otras mutaciones de región bisagra IgG que mejoran la afinidad de la interacción FcRn-IgG, lo que produce una semivida extendida para la IgG modificada. Entre los ejemplos de dichas modificaciones adicionales o alternativas se incluyen mutaciones en uno o más residuos de región constante de IgG correspondientes a: Thr250, Met252, Ser254, Thr256, Thr307, Glu308, Met428, His433 y/o Asn434 (tal como se describe adicionalmente en Shields, R.L. y col. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604; Petkova, S.B. y col. (2006) *Int. Immunol.* 18: 1759-1769; Hinton, P.R. y col. (2004) *J. Biol. Chem.* 279: 6213-6216; Kamei, D.T. y col. (2005) *Biotechnol. Bioeng.* 92: 748-760; Vaccaro, C. y col. (2005) *Nature Biotechnol.* 23: 1283-1288; Hinton, P.R. y col. (2006) *J. Immunol.* 176: 346-356).
- 20
- [0083]** Como alternativas adicionales a las mutaciones de región bisagra, se han descrito otras modificaciones de estabilización de la región constante de IgG4. Por ejemplo, una mutación de la región constante de IgG4 humana puede comprender la sustitución de la región CH3 de IgG4 por una región CH3 de IgG1, la sustitución de las regiones CH2 y CH3 de IgG4 por las regiones CH2 y CH3 de IgG4 o la sustitución de la arginina en la posición 409 de la región constante de IgG4 (según numeración de Kabat) por una lisina, tal como se describe adicionalmente en la publicación de patente de EE.UU. 2008/0.063.635. Una mutación de la región constante de
- 25
- 30 **[0084]** IgG4 humana puede comprender la sustitución de Arg409, Phe405 o Lys370 (según numeración de Kabat), tal como la sustitución de Arg409 por Lys, Ala, Thr, Met o Leu, o la sustitución de Phe405 por Ala, Val, Gly o Leu, tal como se describe adicionalmente en la publicación PCT WO-2008/145.142.
- Puede introducirse una mutación deseada en el dominio de región constante de IgG4 humana usando técnicas estándar de ADN recombinante, tales como mutagenia dirigida al sitio o mutagenia mediada por PCR de un ácido nucleico que codifica la región constante de IgG4 humana. Además, puede introducirse ADN que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo en un vector de expresión que codifica una región constante de IgG4 humana mutada de manera que la región variable y la región constante quedan ligadas operativamente, para crear de este modo un vector que codifica una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa en la que la
- 35
- 40 **[0085]** región constante es una región constante de IgG4 humana mutada. A continuación puede usarse el vector de expresión para expresar la cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa usando procedimientos estándar de expresión de proteína recombinante. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF de la invención puede construirse tal como se describe en mayor detalle en el Ejemplo 1.
- 45
- 50 **[0085]** La semivida de eliminación terminal de un anticuerpo puede determinarse usando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, después de la administración del anticuerpo a un sujeto (por ejemplo, un mono cynomolgus, una rata Sprague-Dawley), pueden obtenerse muestras de sangre en diversos puntos de tiempo después de la administración y la concentración de anticuerpo en el suero las muestras de sangre puede determinarse usando una técnica conocida en la técnica para determinar concentración de anticuerpos (por ejemplo, un ensayo ELISA). El cálculo de la semivida terminal del anticuerpo puede realizarse mediante procedimientos farmacocinéticos conocidos, usando por ejemplo un sistema informático y un software diseñados para calcular parámetros farmacocinéticos (un ejemplo no limitativo de los cuales es el SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System con software WinNonlin).
- 55 **B. Regiones variables de anticuerpos**

**[0086]** Las regiones variables de anticuerpos preferidas para su uso en el anticuerpo anti-NGF de la invención son las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo PG110. La región variable de cadena pesada de PG110 se muestra en SEQ ID NO: 1 y la región variable de cadena ligera de PG110 se muestra

en SEQ ID NO: 2. En consecuencia, en una realización, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En otra realización más, el anticuerpo anti-NGF de la invención  
5 comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

**[0087]** La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada de PG110 (regiones variables y constantes) se muestra en SEQ ID NO: 13. Esta cadena pesada puede prepararse a partir de una  
10 cadena pesada precursora, que incluye una secuencia de guía o de señal, tal como la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12. La cadena pesada precursora de SEQ ID NO: 12 es codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 11.

**[0088]** La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera de PG110 (regiones variables  
15 y constantes) se muestra en SEQ ID NO: 16. Esta cadena ligera puede prepararse a partir de una cadena ligera precursora, que incluye una secuencia de guía o de señal, tal como la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15. La cadena ligera precursora de SEQ ID NO: 15 es codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 14.

**[0089]** En consecuencia, en otra realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de  
20 SEQ ID NO: 13, en la que el anticuerpo tiene una semivida en suero en un mono cynomolgus de al menos 15 días. En otra realización, la semivida en suero en un mono cynomolgus puede estar comprendida en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 22 días (o en un intervalo de 15-22 días). En otras realizaciones, la  
25 semivida en suero en una rata puede ser de al menos 8 días o estar comprendida en un intervalo de aproximadamente 8 días a aproximadamente 9 días (o en un intervalo de 8-9 días). En otras realizaciones más, la semivida en suero en un ser humano puede ser de al menos 10-30 días, o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o al menos 40 días o estar comprendida en un intervalo  
30 de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días (o en un intervalo de 10-40 días) o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 15-30 días). De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). Preferentemente, la  
35 cadena pesada es codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11. Preferentemente, la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. Preferentemente, la cadena ligera es codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14.

**[0090]** En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las  
40 reivindicaciones que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

**[0091]** La memoria descriptiva describe un anticuerpo anti-NGF que comprende una cadena pesada  
45 codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14.

**[0092]** Dado que la especificidad de la unión de PG110 es proporcionada por las regiones determinantes de  
50 complementariedad (CDR) del dominio variable, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende las CDR de la cadena pesada de PG110, y la cadena ligera de PG110. Las CDR de cadena pesada 1, 2 y 3 de PG110 se muestran en SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente. Las CDR de cadena ligera 1, 2 y 3 de PG110 se muestran en SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente. En consecuencia, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una  
región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente. El anticuerpo anti-NGF de la invención también comprende una región  
variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID  
55 NO: 6, 7 y 8, respectivamente. El anticuerpo anti-NGF de la invención comprende así una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente.

**[0093]** El anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede comprender regiones variables de cadenas pesadas y ligeras que comprende secuencias de aminoácidos que son homólogas con regiones variables de cadenas pesadas y/o ligeras de PG110, y en el que los anticuerpos conservan la estabilidad *in vivo* mejorada mostrada por PG110. Por ejemplo, la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-NGF puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos homóloga al 90%, más preferentemente al menos homóloga al 95%, más preferentemente al menos homóloga al 97% y más preferentemente todavía al menos homóloga al 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-NGF puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos homóloga al 90%, más preferentemente al menos homóloga al 95%, más preferentemente al menos homóloga al 97% y más preferentemente todavía al menos homóloga al 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

**[0094]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que debe introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)) que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de pesos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

**[0095]** El anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede comprender regiones variables de cadenas pesadas y ligeras que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadenas pesadas y/o ligeras de PG110 pero en las que se han introducido una o más sustituciones conservadoras en la o las secuencias de manera que el anticuerpo conserva la estabilidad *in vivo* mejorada mostrada por PG110. Por ejemplo, la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-NGF puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con la salvedad de 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácidos conservadoras en comparación con SEQ ID NO: 1. La región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-NGF puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 con la salvedad de 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácidos conservadoras en comparación con SEQ ID NO: 2.

**[0096]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "sustitución de aminoácido conservadora" pretende referirse a modificaciones de aminoácido que no afectan o alteran significativamente las características de unión o estabilidad del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en un anticuerpo de esta descripción mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagenia dirigida al sitio y mutagenia mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son aquéllas en las que el residuo de aminoácidos es sustituido por un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificada en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones variables de PG110 pueden ser sustituidos por otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado puede someterse a ensayo en cuanto a la conservación de la función usando los ensayos funcionales descritos en la presente memoria descriptiva.

**[0097]** El anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede comprender regiones de unión a antígenos (es decir, regiones variables) que se unen al mismo epítipo en NGF que el anticuerpo PG110 o que mantienen competencia cruzada por la unión a NGF con PG110. En consecuencia, el

anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede competir por la unión a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

5

**[0098]** Dichos anticuerpos en competencia cruzada pueden identificarse basándose en su capacidad para la competencia cruzada con PG110 en ensayos estándar de unión a NGF. Por ejemplo, pueden usarse ensayos ELISA estándar en los que se inmoviliza una proteína de NGF recombinante (por ejemplo, NGF- $\beta$  humano) en la placa, se marca uno de los anticuerpos por fluorescencia y se evalúa la capacidad de anticuerpos no marcados para competir con la unión del anticuerpo marcado. De forma adicional o alternativa, es posible usar análisis BIAcore para evaluar la capacidad de los anticuerpos para la competencia cruzada. Los ensayos de unión adecuados que pueden usarse para probar la capacidad de un anticuerpo de competir por la unión a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se describen en mayor detalle en el Ejemplo 2.

**[0099]** En otras realizaciones adicionales, un anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones muestra una o más propiedades funcionales del anticuerpo PG110. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF de la invención puede mostrar una o más de las siguientes propiedades funcionales:

20

a) se une a NGF humano pero no se une a factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) humano, neurotrofina 3 (NT-3) humana o neurotrofina 4 (NT-4) humana;

25

b) se une a NGF humano o de rata con una  $K_D$  de 100 pM o menos;

c) inhibe la unión de NGF a TrkA o p75<sup>NTR</sup>;

d) inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1;

30

e) inhibe la supervivencia del ganglio de la raíz posterior de pollo dependiente de NGF;

f) inhibe el crecimiento de neuritas en células PC12 dependiente de NGF.

Estas propiedades funcionales pueden valorarse usando los ensayos *in vitro* expuestos en detalle en los Ejemplos 2 y 3. Con respecto a la unión específica del anticuerpo a NGF humano, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “no se une a factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3) humana o neurotrofina 4 (NT-4) humana” pretende significar que la magnitud de unión observada del anticuerpo a BDNF, NT-3 o NT-4, en un ensayo de unión estándar (por ejemplo, ELISA, u otro ensayo *in vitro* adecuado tal como se describe en los Ejemplos) es comparable con los niveles de unión de base (por ejemplo, para un anticuerpo de control), por ejemplo no más de 2 veces por encima de los niveles de base, o menos del 5% de unión a BDNF, NT-3 o NT-4 en comparación con unión a NGF humano (en el que el nivel de unión a NGF humano se determina como la unión al 100%).

**[0100]** En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) tal como se define en las reivindicaciones que comprende una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y en el que el anticuerpo se une a NGF humano o de rata con una  $K_D$  de 100 pM o menos (o, alternativamente, con una  $K_D$  de 300 pM o menos, 200 pM o menos, 150 pM o menos, 75 pM o menos o 50 pM o menos), inhibe la unión de NGF a TrkA o p75<sup>NTR</sup> con una  $IC_{50}$  de 250 pM o menos (o, alternativamente, con una  $IC_{50}$  de 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos o 200 pM o menos), e inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1 con una  $IC_{50}$  de 50 ng/ml o menos (o, alternativamente, con una  $IC_{50}$  de 150 ng/ml o menos, 100 ng/ml o menos, 75 ng/ml o menos o 40 ng/ml o menos). Preferentemente, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días, o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días (o en un intervalo de 10-40 días) o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 15-30 días). De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de

55

- cuatro a ocho semanas). De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida de eliminación terminal media en un mono cynomolgus de al menos 15 días y normalmente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 días (o en un intervalo de 15-22 días), o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 15-28 días) o en un intervalo de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 21-28 días). De forma adicional o alternativa, el anticuerpo puede mostrar una semivida de eliminación terminal en ratas de al menos 8 días, normalmente en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 9 días (o en un intervalo de 8-9 días). El anticuerpo puede mostrar además una o más propiedades funcionales adicionales, tales como unión a NGF humano pero no unión a factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) humano, neurotrofina 3 (NT-3) humana o neurotrofina 4 (NT-4) humana; inhibición de la supervivencia del ganglio de la raíz posterior de pollo dependiente de NGF; y/o inhibición del crecimiento de neuritas en células PC12 dependiente de NGF. Preferentemente, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente una semana a aproximadamente doce semanas después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. El anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o el anticuerpo comprende por la unión a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 25 **[0101]** En otra realización más, el anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones no muestra un efecto de rebote cuando se administra a un sujeto (por ejemplo, el anticuerpo se administra en una dosificación y en una frecuencia tales que se evita un efecto de rebote en el sujeto). Se ha comunicado un efecto de rebote, en el que un anticuerpo anti-NGF muestra una reducción de la eficacia en un sujeto después de un periodo inicial de eficacia tras la administración única o repetida, en modelos de animales y en estudios clínicos de otros anticuerpos anti-NGF. Por ejemplo, dicho efecto referido como un "fenómeno de rebote", se comunicó para un anticuerpo anti-NGF de rata en un modelo de lesión por constricción crónica (LCC) en ratas (Ro, L-S. y col. (1999) *Pain* 79: 265-274). Además, se han comunicado estudios de dolor clínico con el anticuerpo anti-NGF tanezumab (también conocido como RN624, E3, Registro CAS nº 880266-57-9) en los que se observó un periodo de aumento de los episodios adversos, tales como sensibilidad al tacto y sensación de 'pinchazos', después de un periodo analgésico inicial (véase presentación de Hefti, Franz F., Rinat Neuroscience, LSUHSC, Shreveport, Louisiana, 26 de septiembre de 2006). Aunque sin pretender estar limitado por el mecanismo, se cree que la semivida de eliminación terminal prolongada de los anticuerpos anti-NGF de la invención les permite evitar la exhibición de un efecto de rebote. Así, otras ventajas de los anticuerpos anti-NGF de la invención incluyen una actividad *in vivo* más consistente y prolongada en comparación con otros anticuerpos anti-NGF de la técnica anterior. Dada la semivida de eliminación terminal prolongada de los anticuerpos anti-NGF de la invención, pueden usarse dosificaciones menores (en comparación con otros anticuerpos anti-NGF), y el anticuerpo puede usarse en intervalos más frecuentes si fuera necesario, de manera que pueden escogerse los regímenes de dosificación y tiempo del tratamiento de manera que se evite un efecto de rebote en el sujeto.
- 45 **[0102]** En otra realización más, el anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones es capaz de aliviar el dolor durante un periodo largo en un sujeto, por ejemplo el anticuerpo es capaz de aliviar el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente una semana a aproximadamente doce semanas (o durante una semana a doce semanas), después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En una realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente una semana (o al menos una semana) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente dos semanas (o al menos dos semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente cuatro semanas (o al menos cuatro semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente ocho semanas (o al menos ocho semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente doce semanas (o al menos doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos

aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas (o durante cuatro semanas a doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente ocho semanas a aproximadamente doce semanas (o durante ocho semanas a doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto.

**[0103]** La capacidad del anticuerpo de aliviar el dolor en un sujeto puede valorarse usando ensayos establecidos en la técnica. Se describen modelos de animales adecuados para evaluar la duración de alivio del dolor por un anticuerpo anti-NGF, por ejemplo, en la publicación PCT nº WO-2006/131.951 y la publicación de patente de EE.UU. 2008/0.182.978. Entre los ejemplos no limitativos de dichos modelos de animales se incluyen un modelo de dolor neuropático evocado por constricción crónica del nervio ciático, un modelo de dolor posquirúrgico que implica incisión de la pata trasera, un modelo de dolor por artritis reumatoide que implica artritis inducida por adyuvante de Freund completo (AFC) y modelos de dolor por cáncer tal como se describe en Halvorson, K.G. y col. (2005) Cancer Res. 65: 9426-9435 y Sevcik, M.A. y col. (2005) Pain 115: 128-141. Además, el alivio del dolor puede evaluarse clínicamente en seres humanos y la duración del alivio del dolor puede determinarse basándose en los niveles de dolor comunicados por el sujeto o los sujetos humanos que están recibiendo tratamiento con el anticuerpo anti-NGF.

**[0104]** Los anticuerpos anti-NGF pueden comprender una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF descrito en la técnica. Por ejemplo, en la presente memoria descriptiva se describe una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF tal como se describe en la publicación PCT nº WO-2001/78.698, la publicación PCT nº WO-2001/64.247, la publicación PCT nº WO-2002/096.458, la publicación PCT nº WO-2004/032.870, la publicación PCT nº WO-2004/058.184, la publicación PCT nº WO-2005/061.540, la publicación PCT nº WO-2005/019.266, la publicación PCT nº WO-2006/077.441, la publicación PCT nº WO-2006/131.951, la publicación PCT nº WO-2006/110.883, la publicación PCT nº WO-2009/023.540, la patente de EE.UU. nº 7.449.616; la publicación de EE.UU. nº US-2005/0.074.821, la publicación de EE.UU. nº US-2008/0.033.157, la publicación de EE.UU. nº US-2008/0.182.978 o la publicación de EE.UU. nº US-2009/0.041.717.

**[0105]** Un anticuerpo anti-NGF puede comprender una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF que se prepara mediante un procedimiento estándar conocido en la técnica para obtener anticuerpos monoclonales, tal como la técnica de hibridación de células somáticas estándar descrita por Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495 para crear anticuerpos monoclonales no humanos (anticuerpos que a continuación pueden ser humanizados), así como procedimientos o técnicas de bibliotecas de expresión de fagos que usan animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana. Las técnicas de bibliotecas de expresión de fagos para selección de anticuerpos se describen, por ejemplo, en McCafferty y col., Nature, 348: 552-554 (1990). Clarkson y col., Nature, 352: 624-628 (1991), Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) y Hoet y col. (2005) Nature Biotechnology 23, 344-348; patentes de EE.UU. nº 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 para Ladner y col.; patentes de EE.UU. nº 5.427.908 y 5.580.717 para Dower y col.; patentes de EE.UU. nº 5.969.108 y 6.172.197 para McCafferty y col.; y patentes de EE.UU. nº 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 para Griffiths y col. Los procedimientos de uso de animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana para preparar anticuerpos se describen, por ejemplo, en Lonberg, y col. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, Harding, F. y Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764: 536-546; patentes de EE.UU. nº 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas para Lonberg y Kay; patente de EE.UU. nº 5.545.807 para Surani y col.; publicaciones PCT nº WO-92/03.918, WO-93/12.227, WO-94/25.585, WO-97/13.852, WO-98/24.884 y WO-99/45.962, todas para Lonberg y Kay; publicaciones PCT WO-02/43.478 para Ishida y col., patentes de EE.UU. nº 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 para Kucherlapati y col.

**[0106]** En varias realizaciones, un anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Además, el anticuerpo puede ser uno en el que se hayan eliminado los epítopos potenciales de linfocitos T. Los procedimientos de eliminación de epítopos potenciales de linfocitos T para reducir con ello la potencial inmunogenicidad de un anticuerpo se han descrito en la técnica (véase por ejemplo, publicación de patente de EE.UU. nº 2003/0.153.043 de Carr y col.).

**[0107]** Un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede derivarse de o ligarse con otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). En consecuencia, los anticuerpos y partes de anticuerpos de la invención pretenden incluir formas derivadas y modificadas por otros medios de los anticuerpos PG110 descritos en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, un anticuerpo o parte

de anticuerpo de la invención puede estar ligado funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otros) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra molécula (tal como una región núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

**[0108]** Un tipo de anticuerpo derivado se produce por entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Entre los agentes de entrecruzamiento adecuados se incluyen aquéllos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos claramente separados por un separador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos agentes de entrecruzamiento están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

**[0109]** Entre los agentes detectables útiles con los que puede derivarse un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención se incluyen compuestos fluorescentes. Entre los ejemplos de agentes detectables fluorescentes se incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo y ficoeritrina. Un anticuerpo puede derivarse también con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y glucosa-oxidasa. Cuando un anticuerpo se deriva con una enzima detectable, es detecta por la adición de reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente como agente detectable la peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo puede derivarse también con biotina, y detectarse a través de medida indirecta de la unión a avidina o estreptavidina.

### 25 **III. Producción de anticuerpos**

**[0110]** Otro aspecto de la presente descripción se refiere a moléculas de ácidos nucleicos tal como se define en las reivindicaciones que codifican los anticuerpos de la presente descripción. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es "aislado" o "convertido en sustancialmente puro" cuando se purifica a partir de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, lo que incluye tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, y col., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la presente descripción puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. En una realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc. Los ácidos nucleicos de la presente descripción pueden obtenerse usando técnicas estándar de biología molecular.

**[0111]** Una molécula preferida de ácido nucleico de la invención comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11. Otra molécula preferida de ácido nucleico de la invención comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14.

**[0112]** Una vez que se obtienen fragmentos de ADN que codifican segmentos de  $V_H$  y  $V_L$ , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpos de longitud completa de manera que la región variable está ligada operativamente a la región constante (véase por ejemplo, Ejemplo 1). El término "ligado operativamente", tal como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco.

**[0113]** Los anticuerpos pueden producirse en una célula hospedadora usando procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202). Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, los ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden insertarse en vectores de expresión de manera que los genes estén ligados operativamente con secuencias de transcripción y de traducción. En este contexto, el término "ligado operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo está ligado en un vector de manera que las secuencias de control de transcripción y de traducción dentro del vector sirven para su función pretendida de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen de manera que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de cadena ligera del anticuerpo y el gen de cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en un vector separado o, más normalmente, los dos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan

en el vector de expresión mediante procedimientos estándar (por ejemplo, conexión de sitios de restricción complementarios en el fragmento de genes de anticuerpo y el vector, o unión de extremos romos si no existen sitios de restricción). Además, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpos desde una célula hospedadora. El gen de cadena de anticuerpos puede ser clonado en el vector de manera que el péptido de señal se liga en marco con el terminal amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína que no es una inmunoglobulina).

**[0114]** Además de los genes de cadenas de anticuerpos, los vectores de expresión recombinantes llevan normalmente secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadenas de anticuerpos en una célula hospedadora. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadenas de anticuerpos. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la materia observarán que el diseño del vector de expresión, incluida la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora que se va a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Entre las secuencias reguladoras preferidas para expresión de células hospedadoras de mamíferos se incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus del simio 40 (SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de los adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. Alternativamente, pueden usarse secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de ubiquitina o el promotor de  $\beta$ -globina. Además, los elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRa, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición de terminal largo del virus linfotrópico T humano de tipo 1 (Takebe, Y. y col. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466-472).

**[0115]** Además de los genes de cadenas de anticuerpos y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las que ha sido introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas para Axel y col.). Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que ha sido introducido el vector. Entre los genes marcadores seleccionables preferidos se incluyen el gen de dihidrofolato-reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección G418).

**[0116]** Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera son sometidos a transfección en una célula hospedadora mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" pretenden comprender una amplia variedad de técnicas usadas comúnmente para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación por fosfato de calcio y transfección por DEAE-dextrano. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos en células hospedadoras procariontas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y con la máxima preferencia células hospedadoras de mamíferos, es la más preferida dado que en dichas células eucariotas, y en particular las células de mamíferos, es más probable que en las células procariontas que tenga lugar un ensamblaje y secreción de un anticuerpo adecuadamente plegado e inmunológicamente activo. Se ha comunicado que la expresión procarionta de genes de anticuerpos es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6: 12-13).

**[0117]** Entre las células hospedadoras de mamíferos preferidas para la expresión de los anticuerpos recombinantes de la presente descripción se incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159: 601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de genes GS desvelado en los documentos WO-87/04.462 (para Wilson), WO-89/01.036 (para Bebbington) y EP-338.841 (para Bebbington). Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células hospedadoras de mamíferos, los anticuerpos son producidos por cultivo de las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se desarrollan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando



procedimientos estándar de purificación de proteínas.

**[0118]** En una realización preferida, la invención proporciona un vector de expresión que codifica un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones, en el que el vector comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 que codifica una cadena pesada de anticuerpo y la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14 que codifica una cadena ligera de anticuerpo. Un vector de expresión preferido de la invención comprende el gen GS (glutamina-sintetasa). En otra realización preferida, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende un vector de expresión de la invención, tal como se define en las reivindicaciones. Una célula hospedadora preferida de la invención es una célula CHO (de ovario de hámster chino). En otra realización preferida más, la invención proporciona un procedimiento de expresión de un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones, que comprende el cultivo de una célula hospedadora que comprende un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 (que codifica una cadena pesada de anticuerpo) y la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14 (que codifica una cadena ligera de anticuerpo) de manera que se expresa un anticuerpo anti-NGF que comprende una cadena pesada codificada por SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera codificada por SEQ ID NO: 14.

**[0119]** La memoria descriptiva describe un procedimiento para preparar un anticuerpo anti-NGF que tiene una mutación en una región constante del anticuerpo (por ejemplo, una mutación de región bisagra), comprendiendo el procedimiento la introducción de la mutación apropiada en la región constante, por ejemplo mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, la memoria descriptiva describe un procedimiento para preparar un anticuerpo anti-NGF, en el que el anticuerpo comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (y, por ejemplo, en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días, o de forma adicional o alternativa, tiene una semivida farmacológica media en seres humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas, o en un intervalo de cuatro a seis semanas, o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas, o en un intervalo de cuatro a siete semanas, o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas o en un intervalo de cuatro a ocho semanas), en el que el procedimiento para preparar el anticuerpo comprende la mutación de la serina en la posición de aminoácido 108 de SEQ ID NO: 9 a prolina para crear la región constante de IgG4 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Preferentemente, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Preferentemente, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Preferentemente, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. Preferentemente, la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.

#### **IV. Composición farmacéutica**

**[0120]** En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, tal como se define en las reivindicaciones, que contiene un anticuerpo de la invención formulado junto con un soporte farmacéuticamente aceptable. En realizaciones preferidas, la composición farmacéutica es adecuada para administración por vía intravenosa, subcutánea (por ejemplo, por medio de un bolígrafo de inyección) o intraarticular, aunque en la presente memoria descriptiva se describen otras vías de administración adecuadas. En una realización, la composición puede incluir una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos que se unen a diferentes epítopos en NGF.

**[0121]** Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "soporte farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cualesquiera de los disolventes, sales, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, que son fisiológicamente compatibles. Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo puede estar recubierto con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

**[0122]** Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto de origen y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (véase por ejemplo, Berge, S.M., y col. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Entre los ejemplos de dichas sales se incluyen sales de adición ácida y sales de adición básica. Las sales de adición ácida incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso, así como de ácidos orgánicos no tóxicos como ácidos alifáticos monocarboxílico y dicarboxílico, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos

hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos. Las sales de adición básica incluyen las derivadas de metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina.

5

**[0123]** Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en solitario o en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos uno o más agentes farmacéuticos adicionales. Por ejemplo, pueden administrarse al menos uno o más agentes farmacéuticos adicionales por separado o también pueden incorporarse en X tal como se define en las reivindicaciones de las composiciones. En una realización preferida, se administra un anticuerpo anti-NGF de la invención en combinación con un segundo agente farmacéutico, en el que el segundo agente farmacéutico se selecciona entre el grupo que consiste en AINE, analgésicos (incluidos analgésicos opioides y analgésicos atípicos), anestésicos locales, bloqueos nerviosos, bloqueos con fenol, anticuerpos terapéuticos, esteroides, anticonvulsivos, antidepresivos, capsaicina tópica y agentes antivíricos. Una clase preferida especialmente de segundos agentes farmacéuticos para su uso en el alivio del dolor es la de los analgésicos opioides. De forma adicional o alternativa, puede combinarse un segundo régimen de tratamiento con el uso de un anticuerpo de la invención, por ejemplo en el alivio del dolor. Entre los ejemplos de dichos segundos regímenes de tratamiento se incluyen radioterapia (por ejemplo, para dolor por cáncer), intervenciones quirúrgicas (por ejemplo, intervenciones en el ganglio de Gasser y ablativas retrogasserianas (aguja) para neuralgia del trigémino), hipnosis y acupuntura.

**[0124]** Entre los ejemplos de AINE se incluyen salicilatos acetilados que incluyen aspirina; salicilatos no acetilados que incluyen salsalato, diflunisal; ácidos acéticos que incluyen etodolaco, diclofenaco, indometacina, ketorolaco, nabumetona; ácidos propiónicos que incluyen fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, oxaprocina; fenamatos que incluyen meclofenamato, ácido mefenámico; fenilbutazona, piroxicam; inhibidores de COX-2 que incluyen celecoxib, etoricoxib, valdecoxib, rofecoxib, lumiracoxib. Entre los ejemplos de analgésicos se incluyen paracetamol (acetaminofeno), tramadol, tapentadol, capsaicina (tópica), analgésicos opioides y analgésicos atípicos. Entre los ejemplos de analgésicos opioides se incluyen morfina, codeína, tebaina, hidromorfona, hidrocodona, oxicodona, oximorfona, desomorfina, diacetilmorfina, nicomorfina, dipropanoil morfina, bencilmorfina, etilmorfina, fentanilo, pethidina, metadona, tramadol y propoxifeno. Entre los ejemplos de analgésicos atípicos se incluyen antidepresivos tricíclicos, carbamacepina, gabapentina, pregabalina, duloxetina y cafeína. Entre los ejemplos de esteroides se incluyen corticosteroides intraarticulares (CIA) y prednisona. Entre los ejemplos de anticuerpos terapéuticos se incluyen anticuerpos anti-TNF, tales como Remicade® y Humira®, y anticuerpos antiCD20, tales como Rituxan® y Arzerra™. Entre los ejemplos de agentes antivíricos se incluyen aciclovir y fosfato de oseltamivir (Tamiflu®).

**[0125]** En una realización preferida, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-NGF de la presente invención con al menos uno o más inhibidores de TrkA (por ejemplo, compuestos que antagonizan la actividad de TrkA). Los inhibidores de TrkA pueden funcionar, por ejemplo, mediante interacción extracelular con el receptor TrkA, o mediante interacción intracelular con la maquinaria de transducción de señalización de TrkA (por ejemplo, inhibición de actividad de cinasa TrkA). Entre los ejemplos no limitativos de inhibidores de TrkA extracelulares se incluyen anticuerpos anti-TrkA (tales como los anticuerpos anti-TrkA humanizados descritos en la publicación de patente de EE.UU. nº 2009/0.208.490 y la publicación de patente de EE.UU. nº 2009/0.300.780) y miméticos de péptidos de NGF que antagonizan el TrkA (tal como se describe en Debeir, T. y col. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 4067-4072). Entre los ejemplos no limitativos de inhibidores de TrkA intracelulares se incluyen péptidos de penetración celular que antagonizan la función de TrkA (por ejemplo, tal como se describe en Hirose, M. y col. (2008) J. Pharmacol. Sci. 106: 107-113; Ueda, K. y col. (2010) J. Pharmacol. Sci., March 30, número de 2010) e inhibidores de moléculas pequeñas tales como inhibidores de TrkA cinasa (por ejemplo, tal como se describe en Wood, E.R. y col. (2004) Bioorg. Med. Chem. Lett. 14: 953-957; Tripathy, R. y col. (2008) Bioorg. Med. Chem. Lett. 18: 3551-3555). Otros ejemplos no limitativos de inhibidores de TrkA incluyen ARRY-470 y ARRY-872 (Array Biopharma).

**[0126]** En otra realización preferida, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-NGF de la presente invención con al menos uno o más inhibidores de proteína-cinasa C (PKC) (por ejemplo, compuestos que antagonizan la actividad PKC).

**[0127]** Una composición de la presente invención puede ser para la administración por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Según apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados que se deseen. Preferentemente, el soporte es adecuado

para administración intravenosa, intraarticular, subcutánea, intramuscular, parenteral, intratumoral, intranasal, intravesicular, intrasinovial, oral, mucosa, sublingual, espinal o epidérmica o por instilación en cavidades corporales (por ejemplo, abdomen, cavidad pleural, senos nasales) o en la superficie del ojo, o en los pulmones por administración por inhalación. Para vías de administración particulares, puede elegirse un dispositivo de suministro adecuado para su uso. Por ejemplo, para administración subcutánea o intramuscular, puede usarse un bolígrafo de inyección (por ejemplo, que pueda ser administrado por el propio usuario). Dichos bolígrafos de inyección, también referidos como inyectores, son conocidos en la técnica, incluidos los que contienen una dosis líquida de anticuerpo (como, por ejemplo, un bolígrafo de inyección de un solo uso usado para administrar Humira®) y, más preferentemente, los que contienen una dosis sólida de anticuerpo que se reconstituye en forma líquida inmediatamente antes de la inyección. También para administración subcutánea, puede usarse un implante subcutáneo. Además, el suministro transcutáneo puede conseguirse mediante el uso de un parche cutáneo (piel) tópico (por ejemplo, un parche adhesivo). El suministro transcutáneo también puede conseguirse por inyección de polvo seco (por ejemplo, inyectores disponibles comercialmente en Glide Pharma). Además, para el suministro en los pulmones (por ejemplo, en el tratamiento de asma o tos intratable), puede usarse una solución nebulizada en un dispositivo nebulizador.

**[0128]** Los compuestos activos pueden prepararse con soportes que protegerán el compuesto contra una liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, lo que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, poliácido glicólico, colágeno, poliortoésteres y poliácido láctico. Se patentan muchos procedimientos para la preparación de dichas formulaciones o son conocidos generalmente para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

**[0129]** Para administrar un compuesto de la invención por determinadas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto, o coadministrar el compuesto, con un material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un soporte apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Entre los diluyentes farmacéuticamente aceptables se incluyen suero salino y soluciones tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua-aceite-agua así como liposomas convencionales (Strejan y col. (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

**[0130]** Los soportes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersión inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que algún medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse en las composiciones compuestos activos suplementarios.

**[0131]** Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El soporte puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante la inclusión en la composición de un agente que retarde la absorción como, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

**[0132]** Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por microfiltración con esterilización. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado al vacío y congelación-secado (liofilización) que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo filtrada previamente en condiciones estériles.

**[0133]** Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una

respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo único, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o puede reducirse o aumentarse la dosis proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Una dosis única típica (que puede administrarse según un calendario de dosificación tal como se describe adicionalmente más adelante) puede estar comprendida entre aproximadamente cualquiera de 0,1 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 3.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (3 mg/kg), a 30 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores descritos en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF puede ser para una administración a aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  aproximadamente 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 10 2 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg. En una realización preferida, el anticuerpo anti-NGF es para su administración en una dosis comprendida en un intervalo de aproximadamente 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente 3.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En otra realización preferida, el anticuerpo anti-NGF es para su administración en una dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En otra realización preferida, el anticuerpo anti-NGF es para su administración en una dosis de 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En otra realización preferida, el anticuerpo anti-NGF es para su administración en una dosis de 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En otra 15 realización preferida, el anticuerpo anti-NGF es para su administración en una dosis de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**[0134]** Para administraciones repetidas durante varios días, semanas o meses o más, dependiendo de la dolencia, el tratamiento es sostenido hasta que tiene lugar una supresión deseada de los síntomas o hasta que se alcanzan niveles terapéuticos suficientes (por ejemplo, para reducir el dolor). Una pauta posológica de ejemplo 20 comprende una dosis inicial en un intervalo de aproximadamente 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , seguido por una dosis mensual de mantenimiento de aproximadamente 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  del anticuerpo anti-NGF. En otra realización, una dosis de aproximadamente 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  es para su administración una vez al mes. En otra realización más, una dosis de aproximadamente 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  es para su administración una vez cada dos meses. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas, dependiendo del patrón de descomposición farmacocinética que desee alcanzar el 25 profesional sanitario. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se contempla la dosificación de una a cuatro veces por semana. Sin embargo, dada la larga duración de alivio del dolor por los anticuerpos anti-NGF, puede usarse una dosificación menos frecuente. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es para su administración una vez cada semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez cada 5 semanas, una vez cada 6 semanas, una vez cada 7 semanas, una vez cada 8 semanas, una vez cada 9 semanas, 30 una vez cada 10 semanas, una vez cada 15 semanas, una vez cada 20 semanas, una vez cada 25 semanas, una vez cada 26 semanas, o más. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es para su administración una vez cada 1 mes, una vez cada 2 meses, una vez cada 3 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 5 meses, una vez cada 6 meses, o más.

35 **[0135]** Tal como se expone adicionalmente en el Ejemplo 6, en una realización preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención es para su administración (por ejemplo, a un ser humano) por vía intravenosa en una dosis comprendida en un intervalo de 0,1 mg/kg a 0,2 mg/kg, preferentemente 0,15 mg/kg, una vez cada 12 semanas. En otra realización preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención es para su administración (por ejemplo, a un ser humano) por vía subcutánea en una dosis comprendida en un intervalo de 0,2 mg/kg a 0,4 mg/kg, preferentemente 40 0,3 mg/kg, una vez cada doce semanas. En otras realizaciones más, un anticuerpo anti-NGF de la invención es para su administración en una dosis comprendida en un intervalo de 0,1 mg/kg a 3 mg/kg, o en un intervalo de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg, o en un intervalo de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg, o en un intervalo de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 30 mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 20 mg/kg o en un intervalo de 1 mg/kg a 10 mg/kg.

45 **[0136]** Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte 50 farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación está dictada por y depende directamente de (a) las características singulares del compuesto activo y el efecto terapéutico en particular que se conseguirá, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos. Por ejemplo, los ejemplos no limitativos de formas de unidad de dosificación incluyen 0,2 mg (correspondiente a una dosis de 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en una persona de aproximadamente 70 55 kg), 2 mg (correspondiente a una dosis de 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en una persona de aproximadamente 70 kg) y 7 mg (correspondiente a una dosis de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en una persona de aproximadamente 70 kg).

**[0137]** Entre los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables se incluyen: (1) antioxidantes

solubles en agua, como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio; (2) antioxidantes solubles en aceite, como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfatocoferol; y (3) agentes de quelación de metales, como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico.

5

**[0138]** Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de unidad de dosificación y pueden prepararse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica de la farmacia. La forma de unidad de dosificación tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se someterán a tratamiento; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el soporte farmacéutico requerido. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un soporte material para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se somete a tratamiento, y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un soporte material para producir una única forma de dosificación será generalmente la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un 100%, esta cantidad estará comprendida desde aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 90% de ingrediente activo, preferentemente de aproximadamente el 0,005% a aproximadamente el 70%, con la máxima preferencia de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 30%.

**[0139]** Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se usan en la presente memoria descriptiva significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, normalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural y intraesternal.

25

**[0140]** Entre los ejemplos de soportes acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención se incluyen agua, etanol, polioles (como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

30

**[0141]** Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes de humectación, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. Entre los ejemplos de adyuvantes en particular que son bien conocidos en la técnica se incluyen, por ejemplo, adyuvantes inorgánicos (como sales de aluminio, por ejemplo, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio), adyuvantes orgánicos (por ejemplo, escualeno), adyuvantes de base oleosa, virosomas (por ejemplo, virosomas que contienen una hemaglutinina ligada a membrana y neuraminidasa derivada del virus de la gripe).

35

**[0142]** La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto por procedimientos de esterilización, véase más arriba, como por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

40

**[0143]** Cuando los compuestos de la presente invención son para su administración como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, pueden suministrarse en solitario o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, del 0,001 al 90% (más preferentemente, del 0,005 al 70%, por ejemplo del 0,01 al 30%) de ingrediente activo en combinación con un soporte farmacéuticamente aceptable.

50

**[0144]** Con independencia de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

55

**[0145]** Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración en

particular, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones en particular de la presente invención empleadas, o del éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto en particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, 5 compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones empleadas en particular, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y la historia médica anterior del paciente sometido a tratamiento, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Un médico o veterinario que sea experto en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición 10 farmacéutica en niveles inferiores a los requeridos con el fin de conseguir el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto que resulte la mínima dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente.

15

**[0146]** Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una composición terapéutica de la invención puede ser para su administración con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, como los dispositivos desvelados en las patentes de EE.UU. nº 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 ó 4.596.556. Entre los ejemplos de implantes y 20 módulos bien conocidos útiles en la presente invención se incluyen: la patente de EE.UU. nº 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; la patente de EE.UU. nº 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicaciones a través de la piel; la patente de EE.UU. nº 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente de EE.UU. nº 4.447.224, que desvela un aparato de infusión 25 implantable de flujo variable para suministro continuo de fármacos; la patente de EE.UU. nº 4.439.196, que desvela un sistema de suministro de fármacos osmótico que tiene compartimentos de varias cámaras; y la patente de EE.UU. nº 4.475.196, que desvela un sistema de suministro de fármacos osmótico. Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos para los expertos en la materia.

**[0147]** En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden formularse para asegurar la distribución *in vivo* apropiada. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BHE (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para procedimientos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender 35 una o más fracciones que son transportadas selectivamente en células u órganos específicos, para así potenciar el suministro de fármacos dirigidos (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). Entre las fracciones dirigidas de ejemplo se incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. 5.416.016 para Low y col.); manósidos (Umezawa y col., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticuerpos (P.G. Bloeman y col. (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais y col. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); receptor 40 de proteína A tensioactivo (Briscoe y col. (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134), diferentes especies que pueden comprender las formulaciones de las invenciones, así como componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier y col. (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4: 273.

#### 45 **V. Uso de anticuerpos de la invención**

**[0148]** En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en un procedimiento de atenuación o inhibición de una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF en un sujeto, tal como se define en las reivindicaciones. El anticuerpo anti-NGF se usa para 50 atenuar o aliviar el dolor, por ejemplo, dolor asociado con una enfermedad o dolencia en el que el desarrollo o mantenimiento del dolor está mediado, al menos en parte, por NGF. Entre los ejemplos no limitativos de la enfermedad o dolencia relacionada con el NGF se incluyen dolor inflamatorio, dolor posquirúrgico, dolor postoperatorio (incluido dolor dental), dolor neuropático, neuropatía periférica, neuropatía diabética, dolor por fractura, dolor de articulación gotosa, neuralgia postherpética, dolor por cáncer, dolor por artrosis o artritis 55 reumatoide, ciática, dolores asociados con crisis drepanocíticas, cefaleas (por ejemplo, migrañas, cefalea tensional, cefalea en racimos), dismenorrea, endometriosis, miomas uterinos, dolor musculoesquelético, dolor lumbar crónico, fibromialgia, esguinces, dolor visceral, quistes ováricos, prostatitis, síndrome de dolor pélvico crónico, cistitis, cistitis intersticial, síndrome de la vejiga dolorosa y/o síndrome de dolor de la vejiga, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor por incisión, migraña, neuralgia del trigémino, dolor por quemaduras y/o heridas, dolor

asociado con traumatismo, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor por metástasis óseas, dolor por VIH, eritromelalgia o dolor causado por pancreatitis o cálculos renales, melanoma maligno, síndrome de Sjogren, asma (por ejemplo, asma incontrolado con hiperreactividad respiratoria grave), tos intratable, enfermedades desmielinizantes, alcoholismo crónico, accidente cerebrovascular, síndrome de dolor talámico, dolor por toxinas, dolor por quimioterapia, fibromialgia, trastornos inflamatorios intestinales, síndrome de colon irritable, trastornos inflamatorios oculares, trastornos inflamatorios o inestables de la vejiga, psoriasis, dolencias cutáneas con componentes inflamatorios, quemaduras solares, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, dolencias inflamatorias crónicas, dolor inflamatorio e hiperalgesia y alodinia asociadas, dolor neuropático e hiperalgesia o alodinia asociadas, dolor por neuropatía diabética, causalgia, dolor mantenido de forma simpática, síndromes de desafuerenciación, daño o disfunción del tejido epitelial, trastornos de la motilidad visceral en las regiones respiratoria, genitourinaria, gastrointestinal o vascular, reacciones cutáneas alérgicas, prurito, vitiligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, úlcera gástrica, úlceras duodenales, rinitis vasomotora o alérgica, trastornos bronquiales, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis y visceralgia.

15

**[0149]** Además, el NGF se ha relacionado con la proliferación de cánceres tales como cáncer de próstata, cáncer del tiroides, cáncer de pulmón, prolactinoma y melanoma. En consecuencia, una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF que puede ser tratada usando un anticuerpo anti-NGF es el cáncer, preferentemente el cáncer de próstata, el cáncer del tiroides, el cáncer de pulmón, la prolactinoma o el melanoma. Así, la memoria descriptiva describe el tratamiento del cáncer en un sujeto, preferentemente el cáncer de próstata, el cáncer del tiroides, el cáncer de pulmón, la prolactinoma o el melanoma, que comprende la administración de un anticuerpo anti-NGF al sujeto.

**[0150]** La enfermedad o dolencia relacionada con el NGF puede ser VIH/SIDA. El bloqueo del NGF usando un anticuerpo anti-NGF puede bloquear los macrófagos infectados por VIH, tratando de este modo el VIH/SIDA. En consecuencia, la memoria descriptiva describe el tratamiento de VIH/SIDA en un sujeto, que comprende la administración de un anticuerpo anti-NGF al sujeto.

**[0151]** Entre las enfermedades y dolencias preferidas en particular para el tratamiento según la invención se incluyen dolor inflamatorio (en particular dolor por artrosis o artritis reumatoide), dolor musculoesquelético (en particular dolor lumbar crónico), dolor por cáncer, dolor neuropático (en particular dolor neuropático diabético), dolor por metástasis óseas, cistitis intersticial/síndrome de la vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor por endometriosis y/o miomas uterinos, y dolor postoperatorio.

**[0152]** El dolor y/u otros síntomas asociados con endometriosis y/o miomas uterinos pueden comprender dismenorrea; dolor pélvico crónico no menstrual; dispareunia; disquecia; menorragia; dolor lumbar o abdominal; infertilidad y subfertilidad; disuria; meteorismo y dolor en la micción; náuseas, vómitos y/o diarrea. Los síntomas pueden comprender también síntomas relacionados con lesiones endometriósicas o miomas situados fuera de la cavidad peritoneal que incluyen por ejemplo síndrome de endometriosis torácica manifiesto como hemoptisis, neumotórax o hemotórax, y leiomiomas pulmonar manifiesta como disnea y una masa pulmonar.

**[0153]** En una realización preferida en particular, un anticuerpo anti-NGF de la invención es para su uso en el tratamiento del dolor. Preferentemente, el tipo de dolor tratado se selecciona entre el grupo que consiste en dolor por artrosis, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer y dolor por endometriosis y/o por mioma uterino. En consecuencia, en una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento del dolor en un sujeto de manera que se trata el dolor en el sujeto. Preferentemente, el dolor se selecciona entre el grupo que consiste en dolor por artrosis, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer y dolor por endometriosis y/o por mioma uterino. En consecuencia, en una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento del dolor por artrosis en un sujeto de manera que se trata el dolor por artrosis en el sujeto. En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento del dolor lumbar crónico en un sujeto de manera que se trata el dolor lumbar crónico en el sujeto. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en dolor neuropático diabético en un sujeto de manera que se trata el dolor neuropático diabético en el sujeto. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento del dolor por cáncer en un sujeto de manera que se trata el dolor por cáncer en el sujeto. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de dolor por endometriosis y/o por mioma uterino en un sujeto de manera que se trata el dolor por endometriosis y/o por mioma uterino en el sujeto.

**[0154]** La memoria descriptiva describe un anticuerpo anti-NGF tal como se describe en la presente memoria descriptiva para el tratamiento de una enfermedad relacionada con el NGF. Entre los ejemplos no limitativos de las enfermedades o dolencias relacionadas con el NGF se incluyen los enumerados anteriormente. La invención  
 5 proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento del dolor. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento del dolor seleccionado entre el grupo que consiste en dolor por artrosis, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer y dolor por endometriosis y/o por mioma uterino. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las  
 10 reivindicaciones para su uso en el tratamiento del dolor por artrosis. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento del dolor lumbar crónico. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento del dolor neuropático diabético. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el  
 15 tratamiento del dolor por cáncer. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento del dolor por endometriosis y/o por mioma uterino.

**[0155]** En una realización en particular, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF tal como se define en las reivindicaciones para su uso en un procedimiento de atenuación o inhibición del dolor en un sujeto, en el que  
 20 el anticuerpo alivia el dolor en el sujeto durante un periodo de al menos aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas (o al menos de cuatro a doce semanas, o al menos cuatro semanas, o al menos ocho semanas, o al menos doce semanas, o durante una a doce semanas, o durante cuatro a doce semanas o durante ocho a doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. Preferentemente, el dolor se selecciona entre el grupo que consiste en dolor por artrosis, dolor lumbar  
 25 crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor por endometriosis y dolor por mioma uterino. Preferentemente el anticuerpo anti-NGF es para su administración en una dosis comprendida en un intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a 3 mg/kg, o de 0,1 mg/kg a 3 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, o de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg o en uno de los otros intervalos de dosificación descritos en la presente memoria descriptiva.

**[0156]** La memoria descriptiva describe la atenuación o inhibición de una enfermedad o dolencia relacionada con el factor de crecimiento nervioso (NGF) en un sujeto de manera que se evita un efecto de rebote en el sujeto, por administración al sujeto de un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende una mutación de región bisagra en la posición de aminoácido  
 35 108 de SEQ ID NO: 9, y en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un ser humano de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días, o en un intervalo de 10-40 días, o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días, o en un intervalo de 15-30 días), en el que el anticuerpo se administra al sujeto en una dosificación y en una frecuencia tales que se evita  
 40 un efecto de rebote en el sujeto. La región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Preferentemente, el anticuerpo compite por la unión a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. La enfermedad o dolencia relacionada con el NGF es un dolor preferentemente seleccionado entre el grupo que consiste en dolor por artrosis,  
 45 dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor por endometriosis y dolor por mioma uterino. Preferentemente, el anticuerpo anti-NGF es para su administración en una dosis comprendida en un intervalo de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, más preferentemente de 0,1 mg/kg a 3 mg/kg, o en uno de los otros intervalos de dosificación descritos en la presente memoria descriptiva. Más preferentemente, para evitar un efecto de rebote, el anticuerpo es para su administración en un intervalo de dosificación inferior, por ejemplo en un intervalo de 0,001 mg/kg a 1 mg/kg, o en un intervalo de 0,001 mg/kg a 1 mg/kg o en un intervalo de 0,001 mg/kg a 0,5 mg/kg o en un intervalo de 0,001 mg/kg a 0,3 mg/kg, o en un intervalo de 0,01 mg/kg a 1 mg/kg o en un intervalo de 0,01 mg/kg a 0,5 mg/kg o 0,01 mg/kg a 0,3 mg/kg. Más preferentemente, para evitar un efecto de rebote, el anticuerpo es para su administración en un intervalo de dosificación inferior (tal como se expone anteriormente) y en intervalos más frecuentes, tales como una vez cada  
 50 semana, o una vez cada dos semanas, o una vez cada cuatro semanas.

**[0157]** La memoria descriptiva describe uso del anticuerpo anti-NGF de la invención para la fabricación de un medicamento destinado a atenuar o inhibir una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF en un sujeto. Entre los ejemplos no limitativos de las enfermedades o dolencias relacionadas con el NGF se incluyen los enumerados



anteriormente. La invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dolor. En una realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor seleccionado entre el grupo que consiste en dolor por artrosis, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer y dolor por endometriosis y/o por mioma uterino. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dolor por artrosis. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dolor lumbar crónico. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dolor neuropático diabético. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dolor por cáncer. En otra realización más, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención tal como se define en las reivindicaciones para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de dolor por endometriosis y/o por mioma uterino. En una realización preferida, el anticuerpo anti-NGF es para su administración en una dosis comprendida en un intervalo de aproximadamente 3 µg/kg a aproximadamente 3.000 µg/kg, o en una dosis de 100 µg/kg, o en una dosis de 300 µg/kg. En otra realización preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención es para su administración (por ejemplo, a un ser humano) por vía intravenosa en una dosis comprendida en un intervalo de 0,1 mg/kg a 0,2 mg/kg, preferentemente 0,15 mg/kg, una vez cada 12 semanas. En otra realización preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención es para su administración (por ejemplo, a un ser humano) por vía subcutánea en una dosis comprendida en un intervalo de 0,2 mg/kg a 0,4 mg/kg, preferentemente 0,3 mg/kg, una vez cada doce semanas. En otras realizaciones más, un anticuerpo anti-NGF de la invención es para su administración en una dosis comprendida en un intervalo de 0,1 mg/kg a 3 mg/kg, o en un intervalo de 0,1 mg/kg a 30 mg/kg, o en un intervalo de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg, o en un intervalo de 0,1 mg/kg a 10 mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 30 mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 20 mg/kg o en un intervalo de 1 mg/kg a 10 mg/kg. Sin embargo, se han expuesto otros intervalos de dosificación y dosis en la sección anterior sobre composiciones farmacéuticas.

**[0158]** En una realización preferida, el anticuerpo anti-NGF es para su administración por vía intravenosa. En otra realización preferida, el anticuerpo anti-NGF es para su administración por vía subcutánea o intraarticular. Sin embargo, se han expuesto otras vías de administración adecuadas en la sección anterior sobre composiciones farmacéuticas.

**[0159]** En una realización preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención alivia el dolor en un sujeto al que se administra el anticuerpo durante un periodo largo. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente una semana a aproximadamente doce semanas (o durante al menos de una semana a doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente una semana (o al menos una semana) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente dos semanas (o al menos dos semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente cuatro semanas (o al menos cuatro semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente ocho semanas (o al menos ocho semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente doce semanas (o al menos doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En una realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas (o durante cuatro semanas a doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En una realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un periodo de al menos aproximadamente ocho semanas a aproximadamente doce semanas (o durante ocho semanas a doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto.

**[0160]** En otra realización, el anticuerpo anti-NGF es para su administración junto con un segundo agente farmacéutico o un segundo régimen de tratamiento. El anticuerpo y el segundo agente, o el anticuerpo y el segundo régimen de tratamiento, pueden ser para su administración o pueden realizarse de forma simultánea, o alternativa, el anticuerpo puede ser para su administración primero, seguido por el segundo agente farmacéutico o el segundo régimen, o el segundo agente farmacéutico o régimen puede ser para su administración o realizarse en primer lugar,

seguido por el anticuerpo. Los ejemplos no limitativos de segundos agentes farmacéuticos y segundos regímenes de tratamiento adecuados se exponen en la sección anterior sobre composiciones farmacéuticas. Los segundos agentes farmacéuticos referidos en particular para su uso en combinación con un anticuerpo de la invención son analgésicos opioides. Otros segundos agentes farmacéuticos preferidos para su uso en combinación con un anticuerpo de la invención son inhibidores de TrkA (por ejemplo, inhibidores de TrkA extracelulares o inhibidores de TrkA intracelulares, tal como se describe en detalle en la sección sobre composiciones farmacéuticas) e inhibidores de proteína-cinasa C (PKC).

**[0161]** La memoria descriptiva describe la atenuación o inhibición de una enfermedad o dolencia relacionada con el factor de crecimiento nervioso (NGF) en un sujeto de manera que se evita un efecto de rebote en el sujeto, que comprende la administración al sujeto de un anticuerpo anti-NGF de la invención, tal como un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en el que la región constante de IgG4 humana comprende una mutación (preferentemente una mutación de región bisagra) y en el que el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de al menos 15 días. En otra realización, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 22 días (o en un intervalo de 15-22 días), o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 15-28 días), o en un intervalo de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 21-28 días). En otra realización, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en una rata de al menos 8 días. En otra realización más, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en seres humanos de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, al menos 15 días, al menos 20 días, al menos 25 días; al menos 30 días, al menos 40 días, o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de 10-40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días o en un intervalo de 15-30 días). Entre las mutaciones preferidas se incluyen las descritas en detalle anteriormente. Entre los anticuerpos preferidos se incluyen anticuerpos anti-NGF de las secuencias y/o que tienen las propiedades funcionales descritas en detalle anteriormente. Entre los ejemplos no limitativos de las enfermedades o dolencias relacionadas con el NGF se incluyen los descritos en detalle anteriormente. La memoria descriptiva describe el uso de un anticuerpo anti-NGF de la invención para la fabricación de un medicamento destinado a atenuar o inhibir una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF en un sujeto de manera que se evita un efecto de rebote en el sujeto (por ejemplo, el anticuerpo es para su administración en una dosificación y en una frecuencia tales que se evita un efecto de rebote en el sujeto).

## **VI. Artículos de fabricación**

**[0162]** También dentro del alcance de la presente invención están los kits tal como se definen en las reivindicaciones, que comprenden anticuerpos de la invención, que incluyen opcionalmente instrucciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF. Los kits pueden incluir una etiqueta que indica el uso pretendido del contenido del kit. El término etiqueta incluye cualquier escrito, material de marketing o material grabado suministrado en o con el kit, o que acompaña al kit de otra forma.

**[0163]** Por ejemplo, la memoria descriptiva describe una composición farmacéutica envasada en la que el anticuerpo PG110 (que tiene una cadena pesada tal como se muestra en SEQ ID NO: 13 y que tiene una cadena ligera tal como se muestra en SEQ ID NO: 16), o formas derivadas, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, es envasada en un kit o un artículo de fabricación. El kit de la invención contiene materiales útiles para el tratamiento, que incluye prevención, tratamiento y/o diagnóstico de una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF en un sujeto. En realizaciones preferidas, la enfermedad o dolencia relacionada con el NGF es dolor inflamatorio (en particular dolor por artrosis o artritis reumatoide), dolor musculoesquelético (en particular dolor lumbar crónico), dolor neuropático (en particular dolor neuropático diabético), dolor por cáncer (en particular dolor por metástasis óseas), dolor asociado con endometriosis y/o miomas uterinos y dolor postoperatorio. El kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto o material impreso en o asociado con el recipiente que proporciona información relativa al uso del anticuerpo PG110, para el tratamiento de una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF descrita en la presente memoria descriptiva.

**[0164]** Un kit o un artículo de fabricación se refiere a un producto envasado que comprende componentes con los que administrar un anticuerpo PG110 para el tratamiento de una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF. El kit comprende preferentemente una caja o recipiente que contiene los componentes del kit, y puede incluir también un protocolo para la administración del anticuerpo PG110 y/o un "prospecto". La caja o recipiente contiene componentes de la invención que están contenidos preferentemente en vasos de plástico, polietileno, polipropileno, etileno o propileno. Por ejemplo, entre los recipientes adecuados para el anticuerpo PG110 se incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, bolígrafos, etc.

**[0165]** El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, posología, administración, contraindicaciones y/o advertencias relativos al uso de dichos productos terapéuticos. En una realización, el prospecto informa al lector, lo que incluye un sujeto, por ejemplo, un comprador, a quien se administrará el PG110 para el tratamiento, que el anticuerpo PG110 está indicado para tratamiento de una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF tal como se describe en la presente memoria descriptiva. El prospecto puede describir determinados beneficios terapéuticos del anticuerpo PG110, lo que incluye el alivio del dolor. El prospecto puede incluir una descripción de la dosificación del anticuerpo PG110. El prospecto puede incluir una descripción de la vía y la frecuencia de administración del anticuerpo PG110. El prospecto puede proporcionar también información a los sujetos que recibirán el anticuerpo PG110 acerca de los usos en combinación para fines de seguridad y eficacia. Por ejemplo, en algunas realizaciones el kit comprende además una segunda composición farmacéutica que comprende un producto terapéutico adicional envasado con o promovido conjuntamente con instrucciones para su administración de los dos agentes para el tratamiento de una enfermedad o dolencia relacionada con el NGF. Entre las enfermedades y dolencias para tratamiento preferidas en particular que usan los kits de la invención se incluyen dolor inflamatorio (en particular dolor por artrosis o artritis reumatoide), dolor musculoesquelético (en particular dolor lumbar crónico), dolor neuropático (en particular neuropatía diabética), dolor por cáncer y dolor por metástasis óseas, dolor asociado con endometriosis y/o miomas uterinos, y dolor postoperatorio.

**[0166]** En los siguientes Ejemplos se describen otras realizaciones de la presente invención.

**[0167]** La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes que no deben entenderse como limitativos.

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1: Construcción de un anticuerpo anti-NGF, PG110, con una región bisagra de IgG4 mutada**

**[0168]** En este ejemplo, se creó una forma mutada de un anticuerpo humanizado anti-NGF introduciendo una mutación de serina a prolina en la región bisagra de la región constante de IgG4.

**[0169]** Se usó la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado anti-NGF alfaD11. El anticuerpo alfaD11 humanizado se describe en mayor detalle en las publicaciones PCT WO-2005/061.540 y WO-2006/131.951. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de alfaD11 ( $V_H$  de Hu-alfaD11) se muestra en SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de alfaD11 ( $V_L$  de Hu-alfaD11) se muestra en SEQ ID NO: 2. Las regiones CDR 1, 2 y 3 de  $V_H$  de Hu-alfaD11 se muestran en SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente. Las regiones CDR 1, 2 y 3 de  $V_L$  de Hu-alfaD11 se muestran en SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente.

**[0170]** La secuencia de ácidos nucleicos que codifica  $V_H$  de Hu-alfaD11 se unió al extremo 3' para la región constante IgG4-Pro de Lonza Biologic (que codifica una mutación que altera el residuo de aminoácidos 108 de la secuencia constante de una serina a una prolina). Se introdujo una secuencia de señal derivada de IgG1 murina en el extremo 5' para producir la secuencia de ADNc de cadena pesada de Hu-alfaD11 completa. La secuencia de aminoácidos de la región constante natural de IgG4 humana se muestra en SEQ ID NO: 9, mientras que la secuencia de aminoácidos de la región constante de IgG4 humana mutada se muestra en SEQ ID NO: 10. En SEQ ID NO: 9 y 10, el aminoácido que se muta de serina (en SEQ ID NO: 9) a prolina (en SEQ ID NO: 10) está situado en la posición de aminoácido 108.

**[0171]** La secuencia de ácidos nucleicos que codifica  $V_L$  de Hu-alfaD11 se unió en el extremo 3' a la región constante kappa humana (suministrada por Lonza Biologics) y una secuencia de señal derivada de IgG1 murina introducida en el 5' para codificar de ese modo una región variable de cadena ligera de longitud completa.

**[0172]** Dado que el anticuerpo debía expresarse en codón de ovario de hámster chino (células CHO) se realizó una optimización (Geneart; usando el software GeneOptimizer™) que implicaba una adaptación de las secuencias de anticuerpos a la preferencia codónica de genes de *Cricetulus griseus* (hámster chino). Además, las regiones de contenido en CG muy alto (> 80%) o muy bajo (< 30%) se evitaron en la medida de lo posible. Durante los sitios de entrada ribosómicos, se evitaron los siguientes motivos de secuencias de acción cis: cajas TATA internas, sitios chi y sitios de entrada ribosómicos; segmentos de secuencia ricos en AT o ricos en GC; elementos de

secuencia ARE, INS, CRS (que intervienen en replicación de vectores en bacterias); secuencias repetidas y estructuras secundarias de ARN; sitios de donador y aceptor de empalme (crípticos) y puntos de bifurcación; sitios de enzimas de restricción internos especificados (*Eco* RI, *Hind* III, *Pvu* I y *Not* I). En la solicitud PCT WO-2006/122.822, propiedad de Lonza Biologics PLC se describe en mayor detalle la optimización de secuencias  
5 génicas de anticuerpos, incluida la optimización de codones, y la expresión de genes de anticuerpos en células CHO.

**[0173]** Se clonaron las secuencias de regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera (incluidas las secuencias de señal) en los vectores GS pEE6,4 y pEE12,4, respectivamente (suministradas por Lonza Biologics)  
10 para generar dos vectores génicos simples (SGV). A continuación, se construyó un vector génico doble (DGV) ligando la casete de expresión completa del vector de la cadena pesada vector en el vector de la cadena ligera, para crear un único vector que expresa los genes de las cadenas pesada y ligera completas, así como el gen de GS (glutamina-sintetasa).

**[0174]** El anticuerpo mutante resultante se refirió como PG110. La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de PG110 completa (incluyendo la secuencia de señal, la región variable y la región constante de IgG4 mutada) se muestra en SEQ ID NO: 11. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PG110 completa (incluyendo la secuencia de señal, la región variable y la región constante de IgG4 mutada) se muestra en SEQ ID NO: 12, en la que los residuos de aminoácidos 1-19 constituyen la secuencia de señal y los aminoácidos 20-141  
20 constituyen la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PG110 madura, sin secuencia de señal (incluyendo la región variable y la región constante de IgG4 mutada) se muestra en SEQ ID NO: 13.

**[0175]** La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de PG110 completa (incluyendo la secuencia de señal, la región variable y la región constante kappa) se muestra en SEQ ID NO: 14. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PG110 completa (incluyendo la secuencia de señal, la región variable y la región constante kappa) se muestra en SEQ ID NO: 15, en la que los residuos de aminoácidos 1-20 constituyen la secuencia de señal y los aminoácidos 21-127 constituyen la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera PG110 madura, sin secuencia de señal (incluyendo la región variable y la región constante kappa) se muestra en SEQ ID NO: 16.  
30

**[0176]** Para verificar la expresión del anticuerpo PG110, el DGV que codifica las cadenas pesada y ligera de PG110 se sometió a transfección transitoriamente en células CHOK1SV (suministradas por Lonza Biologics). Las células ( $0,125 \times 10^6$  células viables por pocillo) se sembraron en placas de 24 pocillos en un medio basado en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% y L-glutamina 6 mM, y se incubó durante toda la noche a 37°C  
35 (incubadora de CO<sub>2</sub> al 10%). Antes de la transfección, se sustituyó el medio de siembra por 800 µl de medio nuevo y se incubaron las células durante 1 hora a 37°C.

**[0177]** Para cada transfección se resuspendieron 5 µg del DGV de PG110 en 100 µl de medio de transfección (OptiMEM. Invitrogen). Se usó un vector que codifica otro anticuerpo IgG4/kappa como control positivo y  
40 el tampón sólo se usó como control negativo. Para cada transfección, se diluyeron 5 µl de reactivo Lipofectamine-2000 (Invitrogen) en 100 µl de medio de transfección. Después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se combinaron el ADN y el reactivo de Lipofectamine diluido, se mezclaron y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación se añadió esta mezcla de 205 µl a un pocillo de la placa de 24 pocillos que contenía células. Se incubaron las células durante 68-72 horas a 37°C. Se recogió el  
45 sobrenadante del cultivo y se aclaró por centrifugación antes del ensayo sobre la presencia de anticuerpo.

**[0178]** Se sometió a ensayo el medio de células transfectadas usando un procedimiento ELISA estándar para IgG ensamblada. Ello supuso la captura de las muestras y los patrones en una placa de 96 pocillos recubierta con un Fc de IgG anti-humana. Se reveló el analito unido con un anticuerpo de cadena kappa anti-humana ligado a  
50 peroxidasa de rábano picante y el sustrato cromógeno tetrametilbencidina. El desarrollo de color fue proporcional a la cantidad de anticuerpo ensamblado presente en la muestra. Se prepararon muestras patrón a partir de una reserva obtenida comercialmente de anticuerpo IgG4/kappa. Los resultados demostraron que el DGV que codifica las cadenas pesada y ligera de PG110 era capaz de expresar el anticuerpo ensamblado.

## 55 **Ejemplo 2: Características de unión de anticuerpo anti-NGF mutado PG110**

**[0179]** En este ejemplo, se examinó la especificidad de la unión y la cinética de la unión de PG110, el anticuerpo anti-NGF mutado preparado tal como se describe en el Ejemplo 1.

A. Especificidad de la unión

**[0180]** Se determinó el perfil de selectividad de la unión de PG110 a neurotrofinas humanas usando un ensayo de unión ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática). Se recubrieron las placas de ELISA con 100 ng/pocillo de NGF humano (R&D Systems, n° cat. 256-GF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (R&D Systems, n° cat. 248-BD), neurotrofina 3 (NT3) (R&D Systems, n° cat. 267-N3) o neurotrofina 4 (NT4) (R&D Systems, n° cat. 268-N4). Se añadió PG110 a pocillos recubiertos con neurotrofina en el intervalo de concentración 3 pM - 3 nM. Después de lavado (PBS en 0,5% (v/v) Tween 20, pH 7,3), se detectó la unión de PG110 usando un anticuerpo IgG4 antihumano biotinilado (Rockland Immunochemical Inc., n° cat. 609-1602) acoplado a fosfatasa alcalina ligada a estreptavidina (Sigma Aldrich, n° cat. S2890), seguido por desarrollo de una reacción de color mediante adición de fosfato de 4-metilumbeliferilo (Sigma Aldrich, n° cat. M3168). Se cuantificó el producto de reacción usando un fluorímetro (excitación a 360 nm; emisión a 440 nm).

**[0181]** Los resultados se resumen en el gráfico de la Figura 1. El PG110 se unió a pocillos recubiertos con NGF humano de una forma dependiente de la concentración, con una concentración de unión semimáxima de 726 pM (obtenida de determinaciones por triplicado en una placa de ensayo único). En cambio, el PG110 no mostró una unión medible a pocillos de ensayo recubiertos con BDNF, NT3 o NT4 humanos, que fueron detectables usando anticuerpos de control positivos específicos para estas neurotrofinas. Estos resultados muestran que PG110, cuando se somete a ensayo a concentraciones de hasta 3 nM *in vitro*, se une específicamente a NGF humano y no muestra reactividad cruzada con las neurotrofinas relacionadas.

B. Cinética de la unión

**[0182]** Se usó análisis BIAcore para evaluar la cinética de la unión de la interacción entre PG110 y NGF de rata recombinante (rrNGF) o NGF humano recombinante (rhNGF).

**[0183]** El factor de crecimiento nervioso beta humano recombinante (rhNGF) (R&D Systems, n° cat. 256 GF/CF) o el factor de crecimiento nervioso beta de rata recombinante (rrNGF) (R&D Systems, n° cat. 556 GF/CF) se inmovilizó de forma covalente en chips de sensor CM5 (GE Healthcare, antes Biacore AB, Uppsala, Suecia) por medio de grupos amina primarios usando el kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare), con HBSEP (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) 10 mM, NaCl 150 mM, ácido etileno-diaminotetraacético (EDTA) 3 mM y Tween® 20 al 0,005%, pH 7,4) como tampón de migración. La superficie del chip de sensor se activó mediante inyección de una mezcla de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) 400 mM y N-hidroxisuccinimida (NHS) 100 mM (1:1, v/v) durante 7 minutos a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Se diluyó β-NGF (rh o rr) a 200 ng/ml en acetato de sodio 10 mM de pH 4,0 y se inyectó la solución diluida en la superficie activada en varios momentos para producir diferentes densidades superficiales. Para análisis de interacción cuantitativa, se preparó una densidad superficial de 60 UR por inyección de 50 µl diluidos de β-NGF (tiempo de contacto 5 minutos). Los ésteres de NHS sin reaccionar se desactivaron con 70 µl (tiempo de contacto 7 minutos) de solución de etanolamina (1 M, pH 8,5).

**[0184]** Los parámetros para los experimentos realizados con NGF inmovilizado fueron los siguientes: tampón de migración: HBSEP que contenía 100 µg/ml de albúmina sérica bovina; velocidad de flujo: 25 µl/min; temperatura: 37°C; densidad de ligando: 60 UR/60 UR (para rhNGF/rrNGF); analito: PG110 concentraciones: 2 nM, 4 nM, 8 nM, 17 nM, 33 nM y 66 nM en tampón de migración; tiempo de contacto: 240 segundos; tiempo de disociación: 600 segundos; regeneración: 2 x 1 min. glicina 10 mM, pH 1,5.

**[0185]** Los datos y las evaluaciones cinéticas se realizaron con software GraphPad Prism (versión 5.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA) y software BIAevaluation (versión 4.0.1, GE Healthcare), datos de ajuste al modelo de unión de Langmuir 1:1.

**[0186]** Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 1 (en la que  $K_{aso}$  indica constante de velocidad de asociación,  $K_{diso}$  indica constante de velocidad de disociación y  $K_D$  indica constante de disociación de equilibrio). Los datos indican la media ± (ecm) de 3 determinaciones separadas.

Tabla 1: Constantes cinéticas de interacción de PG110 con NGF inmovilizado

Analito	Ligando	$K_{aso}$ ( $l\ mol^{-1}\ s^{-1}$ )	$K_{diso}$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$
PG110	rh NGF	$1,6 \times 10^5 \pm 3,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^{-5} \pm 3,0 \times 10^{-6}$	$72 \pm 2\ pM$
PG110	rr NGF	$1,7 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^3$	$1,5 \times 10^{-5} \pm 5,6 \times 10^{-6}$	$92 \pm 34\ pM$

Los resultados del estudio mostraron que las interacciones de PG110 con NGF se caracterizaron por una alta unión de afinidad y que no podría detectarse una diferencia significativa en la afinidad ( $K_D$ ) para especies homólogas (humana frente a rata).

5

**[0187]** Se realizó un análisis posterior de la cinética de la unión usando material Fab de PG110 generado por fragmentación de PG110 en papaína-sefarosa (Thermo Scientific). La inmovilización de rhNGF se realizó usando HBSEP como tampón de migración a 25°C. Se activaron las superficies de los chips de sensor por inyección de una mezcla de EDC 200 mM y NHS 50 mM (1:1, v/v) durante 7 minutos a una velocidad de flujo de 10  $\mu$ l/min. Se diluyó rhNGF a 500 ng/ml en acetato de sodio 10 mM de pH 4,0 y se inyectaron 20  $\mu$ l (tiempo de contacto 2 minutos) de la solución diluida sobre las superficies activadas de cada una de tres células para producir niveles de inmovilización de 93,1, 100,3 y 88,7 UR. Los ésteres de NHS sin reaccionar se desactivaron con 70  $\mu$ l (tiempo de contacto 7 minutos) de etanolamina (1 M, pH 8,5).

10

15 **[0188]** Se hizo pasar una serie de concentraciones de Fab de PG110 (0,39, 0,78, 1,56, 3,13, 6,25, 12,5 y 25 nM), en 250  $\mu$ l, sobre superficies rhNGF inmovilizadas frescas a una velocidad de flujo de 50  $\mu$ l/min, 37°C en un tampón de migración de HPSEP que contenía 100  $\mu$ g/ml de albúmina sérica bovina. Se monitorizó la disociación durante 30 minutos, y después del análisis de interacción se consiguió la regeneración completa con un pulso (30  $\mu$ l) de glicina 10 mM pH 1,5. Además, para definir la  $k_{diso}$  muy lenta con más precisión, se monitorizó la disociación de una alta concentración (100 nM) de Fab de PG110 durante 8 horas en cada superficie de rhNGF y se usó para cuantificación de la constante de velocidad de disociación ( $k_{diso}$ ). Los datos se ajustaron globalmente mediante un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando una  $k_{diso}$  fija, determinada desde la medida de disociación extendida. Para evaluar la reproducibilidad de las constantes cinéticas los análisis se realizaron por triplicado en las tres superficies inmovilizadas frescas. Las constantes cinéticas calculadas se resumen en la Tabla 2.

20

25

Tabla 2: Constantes cinéticas de interacción de Fab de PG110 con rhNGF inmovilizado.

Analito	Nivel de inmovilización	$K_{aso} (l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$K_{diso} (s^{-1})$	$K_D$
Fab de PG110	93,1	$3,6 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-5}$	31,3 pM
	100,3	$3,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-5}$	32,7 pM
	88,7	$4,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^{-5}$	27,8 pM
Media		$3,8 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$	$1,1 \times 10^{-5} \pm 0,06 \times 10^{-5}$	$30,6 \pm 0,25$ pM

**Ejemplo 3: Características funcionales del anticuerpo anti-NGF PG110 mutado**

30

**[0189]** En este ejemplo, se examinaron diversas propiedades funcionales de PG110, el anticuerpo anti-NGF mutado preparado tal como se describe en el Ejemplo 1, en ensayo *in vitro*.

A. Inhibición de la unión de NGF a receptores TrkA y p75<sup>NTR</sup>

35

**[0190]** Se realizaron estudios de unión de radioligandos para comparar el efecto inhibitor de PG110 en la unión de NGF a receptores TrkA y p75<sup>NTR</sup> humanos. Se incubaron células HEK293 que expresaban receptores de TrkA o p75<sup>NTR</sup> humanos de longitud completa con <sup>125</sup>I-NGF 2 nM en presencia de PG110 a una concentración final de 0,01-100 nM. En las reacciones se incluyó también NGF sin marcar (con concentración variable entre 0-1 mM). Las reacciones se realizaron en tubos desechables PT1276 de base plana y paredes altas (Thermo Life Sciences). En primer lugar, se combinaron e incubaron en los tubos NGF radiomarcado, NGF sin marcar y anticuerpo PG110 durante 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación, en tampón de unión (1 x PBS, CaCl 0,9 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, Fracción V de BSA al 0,1%, glucosa al 0,1% (p/v)). A continuación, se añadieron 200  $\mu$ l de células preparadas (diluidas a  $5 \times 10^5$  células/ml). Después de 30 minutos más de incubación a temperatura ambiente con agitación vigorosa, se dividió cada reacción en tres tubos de plástico (Microtubo PE de 0,4 ml, Sarstedt 72.700), añadiéndose 100  $\mu$ l de la reacción a cada tubo. Cada microtubo contenía ya 200  $\mu$ l de sacarosa 150 mM en tampón de unión. A continuación se centrifugaron estos tubos a 20.000 x g a 4°C durante 30 segundos para sedimentar las células. La sacarosa proporciona un gradiente de densidad que actúa para secuestrar cualquier NGF radiomarcado desplazado. A continuación se congelaron los tubos en un baño de hielo seco/etanol. Seguidamente se retiraron los extremos de estos tubos congelados en tubos de plástico separados (Naiad Ltd) para recuento usando un contador minigamma

40

45

50

**[0191]** Los resultados se ilustran en los gráficos de las Figuras 2A y 2B, en los que el efecto de PG110 en la

unión de NGF a TrkA se muestra en la Figura 2A y el efecto de PG110 en la unión de NGF a p75<sup>NTR</sup> se muestra en la Figura 2B. El PG110 inhibió la unión de <sup>125</sup>I-NGF a los receptores TrkA y p75<sup>NTR</sup> de una forma dependiente de la concentración, con valores de IC<sub>50</sub> en media geométrica (IC al 95%) de 170 (88-331) pM y 206 (86-491) pM, respectivamente (los dos n = 3). Un anticuerpo de control de isotipo no inhibió la unión de <sup>125</sup>I-NGF a ninguno de los 5 receptores. Estos resultados demuestran que el PG110 bloquea de forma potente la interacción de unión de NGF humano con sus dos receptores *in vitro*.

**B. Ensayo de proliferación de células TF-1**

10 **[0192]** TF-1 es una línea celular eritroleucémica humana que expresa TrkA humano y prolifera en respuesta a NGF. En estos experimentos, se cultivaron células TF-1 en presencia de 10 ng/mL de NGF recombinante humano, de rata o de ratón, con concentraciones crecientes del anticuerpo PG110, y se cuantificó la proliferación celular 40 horas más tarde usando un procedimiento colorimétrico basándose en la reducción metabólica de la sal de tetrazolio amarilla MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrasodio] a formazán de color morado.

15

**[0193]** Antes de su uso en el ensayo, se cultivaron células TF-1 durante 1 semana en RPMI-1640 que contenía suero fetal bovino (SFB) al 10% con 2 ng/ml de GM-CSF (R&D Systems, n° cat. 215-GM-50). Se lavaron las células, se resuspendieron en RPMI-1640 + SFB al 10% a una concentración de 300.000 células/ml y se volvieron a sembrar en microplacas de 96 pocillos (15.000 células/pocillo en 50 µl). Al menos 60 minutos después de la adición a las placas de ensayo de 96 pocillos, se expusieron las células a NGF recombinante humano, de rata o de ratón (10 ng/ml) en RPMI-1640 que contenía FPB al 10% (50 µl/pocillo) que contenía anticuerpo PG110. Se preparó un medio que contenía NGF y anticuerpo de prueba en una concentración de ensayo final 2X al menos 30 minutos antes de añadir células presembradas. Se sometió a ensayo el anticuerpo de prueba en el intervalo de 25 concentración de 0,6 ng/ml a 24 µg/ml. Se incluyeron pocillos de control que contenían medio en solitario o que contenían células TF-1 en ausencia de NGF ("patrón celular"). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Después de un periodo de incubación de 40 horas (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%), se cuantificó la proliferación usando un kit de proliferación celular MTT (ATCC n° cat. 30-1010K). Se añadieron 10 µl de reactivo MTT antes de la incubación durante 4 horas adicionales a 37°C. A continuación se incubaron los pocillos con reactivo detergente (100 µl/pocillo; mezclado suave) para incubación durante toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se 30 registró la absorbancia a 570 nm. Se calcularon los valores promedio finales de DO para medidas por triplicado mediante sustracción del valor medio para el patrón celular.

**[0194]** La incubación de células TF-1 con NGF en presencia de PG110 (0,6 ng/mL-24 µg/mL) dio como resultado una inhibición de proliferación celular relacionada con la concentración. Los resultados se ilustran en los 35 gráficos de las Figuras 3A-3C, en los que la Figura 3A muestra el efecto del tratamiento con PG110 en la proliferación de células TF-1 estimulada por NGF humano, la Figura 3B muestra el efecto del tratamiento con PG110 en la proliferación de células TF-1 estimulada por NGF de rata y la Figura 3C muestra el efecto del tratamiento con PG110 en la proliferación de células TF-1 estimulada por NGF de ratón. El PG110 mostró potencias inhibitoras similares para todos los homólogos del NGF sometido a ensayo y los valores de IC<sub>50</sub> fueron de aproximadamente 30 40 ng/mL. Los valores de IC<sub>50</sub> se resumen a continuación en la Tabla 3 (los valores de IC<sub>50</sub> se expresan como ng/ml):

Tabla 3: Resumen de valores de IC<sub>50</sub> para PG110 en el ensayo de proliferación de células TF-1

NGF recombinante humano			NGF recombinante de rata			NGF recombinante de ratón		
Media geométrica	IC al 95%	n	Media geométrica	IC al 95%	n	Media geométrica	IC al 95%	n
29,4	26,5-32,7	5	27,8	24,5-31,6	5	30,8	27,4-34,5	3

45 **[0195]** Los ensayos de proliferación celular de TF-1 muestran que el PG110 neutraliza de forma equipotente la activación de los receptores de TrkA humanos por NGF humano o de roedor.

**C. Inhibición de la supervivencia del ganglio de la raíz posterior de pollos**

50 **[0196]** Para probar la capacidad de PG110 para inhibir el efecto del NGF en neuronas sensoriales, se usó un ensayo *in vitro* que usaba cultivos primarios de células del ganglio de la raíz posterior (GRP) obtenidas de embriones de pollo de 8 días. En estas condiciones, la supervivencia de GRP de pollo depende de la presencia de NGF exógeno añadido al medio de cultivo.

**[0197]** Se aislaron ganglios de la raíz posterior de embriones de pollo de 8 días y se recogieron en un tubo Falcon de 50 ml (en 5 ml de mezcla de nutrientes Ham F-12 + Glutamax I: GIBCO 31765-027). En cada experimento, el número total de ganglios recogidos fue de aproximadamente 400, que corresponde aproximadamente a 20 embriones. Posteriormente se sometieron los ganglios a tripsinización durante 5 minutos a 37°C (Tripsina-EDTA Euroclone, ECB3052D) y se disociaron con una jeringa de 10 ml (aguja 20G "amarilla") 4-5 veces antes de centrifugar durante 3 minutos a 800 rpm.

**[0198]** Después de una retirada cuidadosa del medio que contenía tripsina, se resuspendieron las células en 10 ml de medio nuevo (mezcla de nutrientes Ham F-12 + Glutamax I), seguido por una repetición del procedimiento de disociación, y se ajustó el volumen del medio para una concentración de siembra de 100.000-400.000 células/ml. Se sembraron las células en ausencia de tratamientos en la mitad del volumen final que contenía suero equino al 20% (Euroclone ECS0091L), usando placas de 24 pocillos múltiples (Falcon 353047) que habían sido recubiertas con poli-L-lisina (100x = 1 mg/ml solución de bromhidrato de poli-L-lisina; Sigma P2636) disuelta en agua destilada (30 minutos bajo UV, seguido de 30 minutos de secado en campana estéril).

**[0199]** Mientras las células se adherían a las placas (30 minutos en incubadora de CO<sub>2</sub> al 5%, 37°C), se prepararon soluciones de NGF o anticuerpo NGF/anti-NGF a concentración 2X en la mitad del volumen final y se añadieron pocillo a pocillo para alcanzar la concentración final correcta (es decir, % final de suero equino = 10%; concentración final de NGF = 5 ng/ml). Se incluyeron pocillos de control que contenían células GRP en ausencia de NGF. Cada condición se sometió a ensayo por duplicado. Después de la adición de NGF o mezclas de NGF/anti-NGF, se devolvieron las placas a la incubadora (CO<sub>2</sub> al 5%, 37°C). Se valoró el número de células 48 horas después, mediante recuento de todas las células GRP observadas a lo largo del diámetro vertical de cada pocillo (microscopio Nikon TMS, aumento 10X). En los recuentos se incluyeron sólo las células GRP, que fueron fácilmente identificables según sus características morfológicas, es decir, células redondas, brillantes, que refractan la luz con largas neuritas.

**[0200]** La potencia de neutralización del NGF del anticuerpo PG110 sometido a ensayo estaba en el intervalo de concentración de 10 ng/ml a 25 µg/ml para neutralización de NGF recombinante humano (rhNGF), NGF recombinante de rata (rrNGF) o NGF recombinante de ratón (rmNGF). En estos experimentos, una inhibición del 100% de la supervivencia era equivalente al número de células contadas cuando las células se cultivaron sin NGF, en ausencia de anticuerpo anti-NGF. Por el contrario, la inhibición del 0% era equivalente al número de células contadas cuando las células se expusieron a 5 ng/ml de la isoforma de NGF pertinente, en ausencia de anticuerpo anti-NGF.

**[0201]** La incubación de células en presencia de PG110 (10 ng/mL-25 µg/mL) dio como resultado una reducción en la supervivencia celular dependiente de la concentración, con una IC<sub>50</sub> entre 10 y 50 ng/mL para todas las especies de homólogos de NGF (n = 1). Estos datos demuestran que el PG110 inhibe la actividad del NGF en las neuronas sensoriales.

#### 40 D. Inhibición del crecimiento de neuritas en células PC12

**[0202]** La PC12 es una línea celular de feocromocitoma de rata (tumor derivado de células cromafines) que expresa los receptores TrkA y p75<sup>NTR</sup> de rata. Cuando se cultivan en placas recubiertas con colágeno en presencia de NGF, las células PC12 se diferencian en neuronas de tipo simpático, que se convierten en prolongaciones planas y en extensión (neuritas). La inhibición del crecimiento de neuritas mediado por NGF se empleó como una medida semicuantitativa *in vitro* de la capacidad de PG110 para inhibir la interacción del NGF con los receptores TrkA y p75<sup>NTR</sup> de rata.

**[0203]** Se cebaron las células PC12 (ECAAC 88022401) (es decir, se preexpusieron a NGF) lavando 100.000 células con medio sin suero (RPMI-1640 con Glutamax I, Gibco-Invitrogen 61870-010) y se sembraron en matraces de cultivo de plástico tratados con colágeno (se empleó colágeno de tipo I, BD 35-4236, como 0,5 mg/ml de solución de trabajo) en RPMI-1640 con Glutamax-I que contenía SFB al 10% y NGF recombinante de rata (R&D Systems, nº cat. 556-NG-100) (100 ng/ml). Antes de la siembra, se hicieron pasar las células suavemente al menos 5 veces a través de una aguja 21G para desagregar los aglomerados celulares. Se retiró el medio que contenía NGF y se cambió dos veces durante el periodo de cebado de 1 semana.

**[0204]** Al término de este periodo, se lavaron las células PC12 cebadas con medio sin suero y se sometieron a tripsinización (Tripsina-EDTA Euroclone, ECB3052D) durante 2-3 minutos en una incubadora humidificada (CO<sub>2</sub> al 5%, 37°C). Se bloqueó la tripsina por adición de medio que contenía suero y se centrifugaron las células, se lavaron



con medio sin suero y se resuspendieron en RPMI-1640 con Glutamax-I que contenía SFB al 10%. Se hicieron pasar las células suavemente al menos 5 veces a través de una aguja 21G para desagregar los aglomerados celulares antes de su resiembra en placas de Petri tratadas con colágeno a una densidad de 50.000 células/ml. Se prepararon tres placas por condición de ensayo. Para la prueba de anticuerpos, se preparó una mezcla de incubación 2X (NGF recombinante de rata + anti-NGF) 1 hora antes de la adición a células presembradas. La concentración final de NGF fue de 20 ng/ml, mientras que el anticuerpo anti-NGF se sometió a ensayo en cuatro diluciones: 20 µg/ml, 2 µg/ml, 200 ng/ml y 20 ng/ml.

**[0205]** El crecimiento de neuritas inducido por NGF se valoró después de 72 horas. En ese momento, se retiró el medio y se lavaron las células con PBS sin calcio y sin magnesio (GIBCO, 10010) y se fijaron durante 30 minutos con formaldehído al 4% en PBS. Las imágenes de microscopio (aumento 20X) se adquirieron usando un microscopio Nikon Eclipse TE2000-E y el software administrador de imágenes IM1000. Se evaluó la inhibición del crecimiento de neuritas y se atribuyeron puntuaciones (++; +/-; --) basándose en el número de células que mostraban un fenotipo no diferenciado (= ausencia de neuritas claramente definidas).

**[0206]** La incubación de células en presencia de PG110 (20 ng/mL-20 µg/mL) inhibió el crecimiento de neuritas mediado por NGF, con una inhibición total evidente a 200 ng/mL, lo que resalta que el PG110 es un inhibidor eficaz de la interacción entre NGF recombinante de rata y sus receptores de neurotrofinas de rata naturales.

#### **Ejemplo 4: Estabilidad *in vivo* de anticuerpo anti-NGF PG110 mutado**

**[0207]** En este ejemplo, se determinó la semivida de eliminación terminal ( $T_{1/2}$ ) del anticuerpo PG110 *in vivo* en ratas y en monos cynomolgus.

##### **A. Estudios en ratas**

**[0208]** Se suministró a ratas Sprague-Dawley una infusión intravenosa (IV) de 10 minutos del anticuerpo PG110 en una dosificación de 3 mg/kg, 30 mg/kg o 100 mg/kg en los Días de estudio 1 y 56. Se realizó una evaluación de los datos toxicocinéticos usando concentración sérica media y puntos de referencia temporal de 6 animales/punto de referencia temporal en cada grupo. Los tiempos de recogida de sangre nominal fueron: antes de la dosis y 0,25, 1, 3, 6 y 24 horas después de la dosis en los Días de estudio 1 y 56 y también 48, 96, 168, 336, 504, 672, 840, 1.008 y 1.176 horas después de la dosis en el Día de estudio 1. El bioanálisis de las muestras séricas fue realizado por Alta Analytical Laboratory usando un procedimiento ELISA validado. El análisis de los datos farmacocinéticos se realizó usando SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System 2.0 con software WinNonlin Professional versión 4.0 (Pharsight Corp.).

**[0209]** Después de la administración IV, los valores de  $T_{máx}$  (el tiempo hasta la concentración sérica máxima) estuvieron comprendidos entre 0,25 y 1 hora, los dos primeros puntos de referencia temporal de recogida de muestras. Todos los animales mostraron disposición bifásica con semividas de eliminación terminal de aproximadamente 8 a 9 días. Más específicamente, en la Tabla 4 se resume a continuación el  $T_{1/2}$ , en horas, para los tres grupos de tratamiento:

Tabla 4: Semivida de eliminación terminal de PG110 en ratas Sprague-Dawley

Nivel de dosis (mg/kg)	Semivida de eliminación terminal (horas)
3	217
30	192
100	207

Así, los valores medios de semivida del grupo estuvieron comprendidos entre 192-217 horas (8-9 días) en las ratas.

##### **B. Primer estudio en monos**

**[0210]** Se suministró a monos cynomolgus una única infusión intravenosa (IV), de aproximadamente 30 minutos, del anticuerpo PG110 en una dosificación de 3 mg/kg, 30 mg/kg o 100 mg/kg. Se dividió a los animales en machos y hembras; se sometió a ensayo cada dosis en 2 machos y 2 hembras (salvo que para 30 mg/kg sólo se sometió a ensayo a 1 hembra). Los tiempos de recogida de sangre nominales para análisis de datos toxicocinéticos fueron: inmediatamente después de la dosis (en un plazo de 2 minutos desde el final de la infusión), 0,25, 1, 3, 6, 24,

48, 96, 168, 336, 504, 672, 840, 1.008, 1.176, 1.344, 1.512 y 1.680 horas después del final de la infusión. El bioanálisis de muestras séricas fue realizado por Alta Analytical Laboratory usando un procedimiento ELISA validado. El análisis de datos farmacocinéticos se realizó usando SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System 2.0 con el software WinNonlin Professional versión 4.0 (Pharsight Corp.).

5

**[0211]** Después de la administración IV, los valores de  $T_{\text{máx}}$  (el tiempo hasta concentración sérica máxima) medido desde el comienzo de la infusión estuvieron comprendidos desde el final de la infusión hasta aproximadamente 1,6 horas. Todos los animales mostraron disposición bifásica (con la excepción de la hembra tratada con 30 mg/kg, que mostró un descenso brusco después del punto de referencia temporal de 504 horas) con semividas de eliminación terminal de aproximadamente 15-22 días. Más específicamente, en la tabla 5 se resume a continuación el  $T_{1/2}$ , en horas, para los seis grupos de tratamiento:

Tabla 5: Semivida de eliminación terminal de PG110 en monos cynomolgus

Nivel de dosis (mg/kg)	Sexo	Semivida de eliminación terminal (horas)
3	F (n = 2)	370
	M (n = 2)	531
30	F (n = 1)	471
	M (n = 2)	450
100	F (n = 2)	383
	M (n = 2)	461

15

Así, los valores medios de semivida del grupo estuvieron comprendidos entre 370-531 horas (15-22 días) en los monos cynomolgus. Los valores medios de semivida fueron generalmente más largos para los machos que para las hembras, aunque dado el pequeño número de animales estudiados no está claro si existe una diferencia estadísticamente significativa.

20

### C. Segundo estudio en monos

**[0212]** Se suministraron a monos cynomolgus infusiones intravenosas semanales del anticuerpo PG110 durante un periodo de cuatro semanas. En los días 1, 8, 15 y 22 se suministró una infusión intravenosa (IV) del anticuerpo PG110 de aproximadamente 30 minutos, en una dosificación de 3 mg/kg, 30 mg/kg o 100 mg/kg. Se dividió a los animales en machos y hembras; cada dosis se probó en 3 machos y 3 hembras. Se recogieron muestras de sangre en serie en los puntos de referencia temporal nominales siguientes: antes de la dosis, inmediatamente después de la dosis (en un plazo de 2 minutos desde el final de la infusión), 0,25, 1, 3, 6, 24 y 168 horas después del final de la infusión en los días 1 y 22. Se recogieron muestras adicionales de todos los animales antes de la dosis en el día 15 y de animales de recuperación en 336, 504, 672, 840, 1.008, 1.176, 1.344, 1.512, 1.680, 1.848, 2.016 y 2.208 horas después de la administración de la dosis final en el día 22. Las horas enumeradas a partir de 24 horas después de la infusión corresponden a los días farmacocinéticos 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 y 92. Todos los tiempos reales de toma de sangre se convirtieron de modo que empezaran en el comienzo de la infusión.

35

**[0213]** El bioanálisis de muestras séricas para análisis de concentración de PG110 fue realizado por Alta Analytical Laboratory usando un procedimiento ELISA validado. El análisis de datos farmacocinéticos se realizó usando SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System 2.0 con el software WinNonlin Professional versión 4.0 (Pharsight Corp.).

40

**[0214]** Después de la administración IV, los valores de  $T_{\text{máx}}$  medios del grupo (el tiempo hasta concentración sérica máxima) medidos desde el comienzo de la infusión estuvieron comprendidos entre aproximadamente 0,6 horas y 2,6 horas. Todos los animales mostraron disposición bifásica, con semividas de eliminación terminal de aproximadamente 21-28 días (503 a 685 horas). Más específicamente, en la Tabla 6 se resume a continuación el  $T_{1/2}$ , en horas, para los seis grupos de tratamiento:

45

Tabla 6: Semivida de eliminación terminal de PG110 en monos cynomolgus

Nivel de dosis (mg/kg)	Sexo	Semivida de eliminación terminal (horas)
3	F (n = 3)	503
	M (n = 3)	564

30	F (n = 3)	511
	M (n = 3)	619
100	F (n = 3)	532*
	M (n = 3)	685
*basado en valor n = 2		

Así, los valores medios de semivida del grupo estuvieron comprendidos entre aproximadamente 21-28 días en los monos cynomolgus. Los valores medios de semivida generalmente fueron más largos para los machos que para las hembras, aunque dado el pequeño número de animales estudiados no está claro si existe una diferencia estadísticamente significativa.

**Ejemplo 5: Potencia de PG110 en comparación con el anticuerpo precursor en ratas**

**[0215]** En este ejemplo, se realizaron experimentos adicionales usando el ensayo de proliferación de células TF1 (tal como se describe en el Ejemplo 3B, anterior) para comparar la potencia de neutralización del NGF de PG110 con su precursor,  $\alpha$ D11 de rata. El anticuerpo  $\alpha$ D11 de rata se suministró como dos lotes separados, uno con una concentración de inicio de 0,73 mg/ml y el otro con una concentración de inicio de 0,63 mg/ml. Se evaluaron los anticuerpos PG110 y  $\alpha$ D11 de rata en ensayos de proliferación de células TF1 mediada por NGF humano o NGF de rata, usando el kit de proliferación celular MTT (ATCC n° cat. 30-1010K).

**[0216]** Antes del uso en los ensayos, se cultivaron células TF1 durante una semana en RPMI-1640 (ATCC cat. #30-2001) que contenía suero fetal bovino al 10% (SFB, Cambrex DE14-801F, Lote 6SB0006) con 2 ng/ml de GM-CSF (R&D Systems, cat. # 215-GM-50). Se lavaron las células, se resuspendieron en RPMI-640 + SFB al 10% a una concentración de 300.000 células/ml y se sembraron en microplacas de 96 pocillos (15.000 células/pocillo, en 50  $\mu$ l).

**[0217]** Al menos 60 minutos después de la adición a placas de ensayo de 96 pocillos, se expusieron las células a NGF recombinante humano o de ratón (10 ng/ml) en medio de cultivo (SFB al 10% en RPMI-1640; 50  $\mu$ l/pocillo) que contenía anticuerpo anti-NGF. Se preparó medio que contenía NGF y el anticuerpo de prueba en una concentración de ensayo final 2X, al menos 30 minutos antes de su adición a las células presembradas. Se sometieron a ensayo los anticuerpos de prueba en el intervalo de concentración de 0,6 ng/ml a 24  $\mu$ g/ml. Se incluyeron siempre pocillos de control, que contenían medio en solitario o contenían células TF1 en ausencia de NGF ("patrón celular"). Cada tratamiento se realizó por triplicado. Después de un periodo de incubación de 40 horas (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%), se añadieron 10  $\mu$ l de reactivo MTT antes de la incubación durante 4 horas adicionales a 37°C. Posteriormente se incubaron los pocillos con Reactivo Detergente (100  $\mu$ l/pocillo; mezclado suave) para incubación durante toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se registró la absorbancia a 570 nm. Se calcularon los valores de DO medios finales para medidas por triplicado mediante sustracción de los valores promedio para el patrón celular. Se ajustó la inhibición máxima correspondiente al valor de DO promedio observado para células cultivadas sin NGF, en ausencia de anticuerpo de prueba. Se ajustó inhibición nula correspondiente al valor de DO promedio observado para células expuestas a 10 ng/ml de NGF en ausencia de anticuerpo de prueba.

**[0218]** Las potencias inhibitoras de los anticuerpos NGF se cuantificaron como valores IC<sub>50</sub> (es decir, la concentración de anticuerpo requerida para reducir al 50% la respuesta proliferativa mediada por el NGF) usando el software GraphPad Prism v 5.01. Se representaron curvas de inhibición individualmente con el fin de obtener valores de IC<sub>50</sub> discretos para cada anticuerpo de prueba en cada experimento. Las medidas de proliferación celular se normalizaron con respecto a los valores de DO máximos obtenidos dentro de ese ensayo, en ausencia de anticuerpo de prueba añadido. A continuación se representaron las respuestas normalizadas con respecto a la concentración de anticuerpo de prueba en una escala logarítmica, y se obtuvieron los valores de IC<sub>50</sub> usando la función de ajuste de curvas no lineal de GraphPad Prism 'log(inhibidor) frente a pendiente variable según respuesta'.

**[0219]** En la Tabla 7 se resume a continuación el efecto inhibitor de PG110 en comparación con su anticuerpo precursor  $\alpha$ D11 de rata.

Tabla 7: Resumen de valores de IC<sub>50</sub> (ng/ml) en ensayo de proliferación de células TF1

Anticuerpo	NGF humano			NGF de rata		
	Media geométrica	IC al 95%	n	Media geométrica	IC al 95%	n
PG110	27,0	25,8-28,3	2	26,2	13,6-50,4	2

$\alpha$ D11 de rata (Lote 1)	63,7	35,7-114	3	44,8	31,4-64,1	3
$\alpha$ D11 de rata (Lote 2)	107	-	1	54,9	-	1

Los resultados indican que el anticuerpo PG110 tiene aproximadamente una potencia 2 veces superior en la neutralización de la actividad de NGF en comparación con su anticuerpo precursor  $\alpha$ D11 de rata. Además, los valores de potencia obtenidos para el lote 2 de  $\alpha$ D11 de rata sugieren que este lote puede tener una potencia menor que el material del lote 1.

#### **Ejemplo 6: El anticuerpo anti-NGF PG110 no muestra un efecto de rebote en un modelo animal**

**[0220]** En este ejemplo, se usó un modelo de lesión cutánea en ratas para examinar la actividad del AcM PG110. El modelo de lesión cutánea en ratas se desarrolló basándose en las observaciones de que las ratas tratadas con anticuerpo anti-NGF desarrollan una respuesta prurítica, con la observación de un aumento en el rascado dependiente de la dosis. La lesión no se asoció con una reducción de innervación en la epidermis. Además, las ratas mostraron una recuperación rápida después de la eliminación del anticuerpo. Esta actividad de lesión cutánea sólo se ha observado en roedores, que tienen una conducta de acicalamiento. Aunque sin pretender estar limitado por el mecanismo, se plantea la hipótesis de que en las ratas tratadas con anti-NGF existe un acicalamiento continuo debido a un deterioro en el bucle de realimentación para detener la respuesta de rascado, lo que provoca una lesión cutánea. A continuación es posible aplicar una puntuación cuantitativa a estas lesiones cutáneas como una medida de la actividad del anticuerpo anti-NGF en las ratas.

**[0221]** En varios estudios clínicos sobre la actividad de los anticuerpos anti-NGF (como el anticuerpo humanizado RN-642, descrito adicionalmente en la publicación de patente de EE.UU. nº 2004/0.237.124 y en Abdiche, Y.N. y col. (2008) Protein Sci. 17: 1326-1335) se ha comunicado que la eficacia del anticuerpo disminuye durante un periodo después de una dosificación (por ejemplo, días 14-21 después de dosificación), seguido por una recuperación de la actividad del anticuerpo. Existen informes sobre el aumento del dolor y/o el aumento de episodios adversos (como sensaciones anómalas, que van desde alodinia a sensación de hormigueo, picor o pinchazos) durante este periodo después de una dosificación en la que disminuye la actividad del anticuerpo. Esta disminución de la actividad del anticuerpo durante un periodo de tiempo después de una dosificación se refiere en la presente memoria descriptiva como un "efecto de rebote."

**[0222]** Para evaluar el efecto del anticuerpo PG110 en las conductas de acicalamiento y rascado en ratas conscientes, se trató a ratas Sprague Dawley macho y hembra con el AcM PG110 (0,003, 0,01, 0,03, 0,3 ó 3 mg/kg), administrado como un bolo i.v., o con un control del vehículo. Las ratas recibieron una dosis semanal durante cuatro semanas. Los criterios de evaluación fueron: número de episodios de acicalamiento y rascado, temperatura corporal, latencia para lamerse las patas, latencia en el salto (intentos de escapar) y número y puntuación de la gravedad de las lesiones cutáneas con el tiempo.

**[0223]** Los resultados indicaron que no se observaron lesiones cutáneas en ratas a las que se administró un vehículo, mientras que en los grupos de ratas a las que se administró PG110 se observaron lesiones cutáneas en todos los animales para todas las dosificaciones de anticuerpos probadas. Por otra parte, el número y la gravedad de las lesiones cutáneas aumentaron con el tiempo y aumentaron con el incremento de las dosificaciones de anticuerpo. El número de episodios de rascado también se incrementó en los animales tratados con anticuerpos, pero el tratamiento con anticuerpos no tuvo ningún efecto en la conducta de acicalamiento, la temperatura corporal, la latencia para lamerse las patas o la latencia en el salto (intentos de escapar).

**[0224]** La gravedad de las lesiones cutáneas se cuantificó usando una puntuación de lesión, que es igual al número de lesiones multiplicado por el área (en mm<sup>2</sup>) de las lesiones. En el gráfico de la Figura 4 se muestran las puntuaciones de lesión con el tiempo para tratamiento con PG110, comparadas con un vehículo. Los resultados revelaron que las ratas tratadas con PG110 mostraron un incremento constante en las puntuaciones de lesión con el tiempo, en particular en las dosis más altas probadas (0,3 mg/kg y 3 mg/kg). Es decir, el anticuerpo no mostró un efecto de rebote significativo en el curso del experimento, lo que sugiere que puede ser posible seleccionar los parámetros de dosificación y frecuencia de administración para su uso en seres humanos de manera que pueda evitarse un efecto de rebote.

**[0225]** Así, en resumen, el modelo de lesión cutánea en ratas ilustra una ventaja del anticuerpo anti-NGF PG110 porque el anticuerpo PG110 no mostró un efecto de rebote apreciable, que ha sido comunicado para otros anticuerpos anti-NGF, lo que sugiere que el PG110 muestra una actividad *in vivo* más consistente y prolongada. Aunque sin pretender estar limitado por el mecanismo, se cree que esta capacidad del PG110 para evitar un efecto

de rebote *in vivo* está relacionada con la semivida de eliminación terminal prolongada que se observa para este anticuerpo.

**Ejemplo 7: Farmacocinética de PG110 humano**

5

**[0226]** Se espera que el PG110 tenga una semivida en seres humanos de aproximadamente 10-30 días (intervalo de 10 a 40 días) con una disposición multifásica. Basándose en un valor  $C_{min}$  objeto de ~0,25 µg/mL (intervalo de ~0,13 µg/mL a 0,40 µg/mL), se espera que dosis IV humanas de 10 mg (~0,15 mg/kg; intervalo de ~0,1 mg/kg [5 mg] a ~0,2 mg/kg [15 mg]) cada 4-12 semanas y dosis SC de 20 mg (~0,3 mg/kg; intervalo de ~0,2 mg/kg [15 mg] a ~0,4 mg/kg [30 mg]) cada 4-12 semanas sean eficaces.

10

**[0227]** Las proyecciones farmacocinéticas humanas se basaron en los datos de concentración de dos especies (rata y mono). La farmacocinética humana se proyectó usando múltiples procedimientos que incluían escalas de los parámetros farmacocinéticos de mono y de rata, escalado alométrico fijo y procedimientos basados en datos preclínicos y clínicos de otros anticuerpos monoclonales. Se realizaron proyecciones para monos y disposición bifásica.

15

**[0228]** *Procedimiento 1:* Las proyecciones farmacocinéticas humanas se basaron en perfiles de concentración-tiempo de PG110 con ajuste de modelo de 2 compartimentos en dos especies (rata y mono). Los parámetros farmacocinéticos humanos de PG110 se proyectaron usando escalado alométrico con exponentes fijos de parámetros farmacocinéticos de mono y rata.

20

**[0229]** Para el aclaramiento:

25

$$CL_{humano} = CL_{animal} \left( \frac{PC_{humano}}{PC_{animal}} \right)^{0,67}$$

**[0230]** Para el volumen de distribución:

30

$$V_{humano} = V_{animal} \frac{PC_{humano}}{PC_{animal}}$$

**Tabla 8. Predicciones de parámetros farmacocinéticos humanos basadas en escalado alométrico con exponentes fijos**

	V <sub>1</sub> mL/kg	CL mL/h/kg	V <sub>2</sub> mL/kg	CL <sub>D</sub> mL/h/kg
	Parámetros farmacocinéticos ajustados al modelo			
Rata	40,2	0,22	36,5	2,23
Mono	29,3	0,10	31,1	1,78
	Parámetros farmacocinéticos humanos predichos			
Valor humano predicho basado en rata	40,2	0,034	36,5	0,35
Valor humano predicho basado en mono	29,3	0,042	31,1	0,75
Promedio	34,7	0,038	33,8	0,55

35

**[0231]** A continuación se calculó la semivida humana de PG110 basándose en los valores de CL y V<sub>1</sub> predichos humanos. La semivida humana predicha de PG110 fue de 26 días.

40

**[0232]** *Procedimiento 2:* Las proyecciones farmacocinéticas humanas se basaron los datos observados de dos especies (rata y mono). Se proyectaron los valores de CL y V humanos usando el mismo procedimiento que en el *Procedimiento 1*. La semivida humana para PG110 se proyectó usando escalado alométrico modificado con exponente fijo en 0,25:

$$T_{1/2,humano} = T_{1/2,animal} \left( \frac{PC_{humano}}{PC_{animal}} \right)^{0,25}$$

**Tabla 9. Predicciones de parámetros farmacocinéticos humanos basadas en escalado alométrico con exponente fijo**

5

	CL (mL/h/kg)		V <sub>ss</sub> (mL/kg)		t <sub>1/2</sub> (días)	
	Rata	Mono	Rata	Mono	Rata	Mono
PG110 observado	0,22	0,098	70	60	8,6	19,1
Valores humanos predichos	0,0343	0,0410	70	60	35,2	37
Valores humanos predichos (promedio)	0,0376		65		36	

Usando el *Procedimiento 2*, la semivida humana PG110 predicha fue de 36 días.

**[0233]** *Procedimiento 3:* Las proyecciones farmacocinéticas humanas se basaron en datos de PG110 en rata y mono y en los parámetros preclínicos y farmacocinéticos clínicos de otros anticuerpos monoclonales. El escalado se basó en la semivida PG110 observada en ratas y monos y en la proporción de semivida de rata/ser humano y mono/ser humano de otros anticuerpos monoclonales. En primer lugar se compararon los parámetros farmacocinéticos estimados (aclaramiento, volumen de distribución y semivida) de otros anticuerpos monoclonales en rata y mono con los de los estudios clínicos. Se estimaron las diferencias entre rata, mono y ser humano como una proporción entre rata/ser humano y mono/ser humano. A continuación se estimaron los parámetros farmacocinéticos humanos para PG110 basándose en sus parámetros farmacocinéticos en rata o mono con una corrección de la proporción rata/ser humano o mono/ser humano para otros anticuerpos monoclonales. Usando el *Procedimiento 3*, la semivida humana de PG110 predicha fue de 11-29 días.

**20 Tabla 10. Predicciones de parámetros farmacocinéticos humanos basadas en la experiencia del pasado con otros anticuerpos monoclonales**

	CL (mL/h/kg)		V <sub>ss</sub> (mL/kg)		t <sub>1/2</sub> (días)	
	R/H	M/H	R/H	M/H	R/H	M/H
Anticuerpo 1	1,35	1,88	1,33	0,53	0,93	0,69
Anticuerpo 2	3,57	1,43	1,65	0,72	0,44	0,49
Anticuerpo 3	1,58	1,46	1,35	0,71	1,05	0,78
Promedio	2,17	1,59	1,45	0,65	0,81	0,65
	Rata	Mono	Rata	Mono	Rata	Mono
PG110 observado	0,22	0,098	70	60	8,6	19,1
Valores humanos predichos	0,101	0,062	48,4	92,0	11	29

R/H: rata/ser humano, M/H: mono/ser humano

**[0234]** *Procedimiento 4:* Las proyecciones farmacocinéticas humanas se basaron en perfiles de concentración de PG100 con ajuste de modelo de 2 compartimentos en dos especies (rata y mono). Los parámetros farmacocinéticos humanos de PG110 se proyectaron usando escalado alométrico con regresión de parámetros farmacocinéticos de mono y rata.

**[0235]** Para el aclaramiento y el volumen de distribución:

30

$$\log (\text{Parámetro farmacológico}) = a \times \log(PC) + b$$

Se realizó una regresión lineal basándose en los parámetros farmacocinéticos y el peso corporal (PC) de rata y mono para estimar la pendiente (a) y el punto de corte (b). A continuación se estimaron los parámetros farmacocinéticos humanos de PG110 usando el PC humano típico y la pendiente y el punto de corte estimados.

**Tabla 11. Predicciones de parámetros farmacocinéticos humanos basadas en escalado alométrico con regresión**

	PC kg	LnPC kg	V1 mL	CL mL/h	V2 mL	CL <sub>D</sub> mL/h
Rata	0,25	-1,387	2,307	-2,907	2,210	-0,585
Mono	5	1,609	4,988	-0,680	5,047	2,188
Pendiente y punto de corte estimados basándose en regresión lineal						
Pendiente			0,8949	0,7432	0,947	0,9255
Punto de corte			3,5475	-1,8766	3,523	0,6982
Parámetros farmacocinéticos humanos predichos						
Ser humano	70	4248	1555	3,600	1894	103

A continuación se calcula la semivida humana PG110 basándose en los parámetros farmacocinéticos humanos predichos. La semivida humana de PG110 predicha fue de 12 días.

- 5 **[0236]** Basándose en estos procedimientos, se espera que el PG110 tenga una semivida en seres humanos de aproximadamente 15-30 días (intervalo de 10 a 40 días) con una disposición bifásica (parámetros farmacocinéticos predichos:  $V_1 = 2,5$  L,  $CL = 5,0$  mL/h,  $V_2 = 2,5$  L,  $CL_D = 40$  mL/h).

#### **Ejemplo 8: Tratamiento de artrosis en seres humanos con PG110**

10

**[0237]** Se inició un estudio clínico humano para probar la seguridad, la tolerabilidad y la farmacocinética de PG110 en pacientes con dolor atribuido a artrosis de la rodilla. A continuación se describe el diseño del estudio y los resultados preliminares.

- 15 **[0238]** En esta Fase I, un estudio de dosis ascendente única en doble ciego controlado por placebo monocéntrico, se evaluaron seis (6) niveles de dosis: 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3 y 1 mg/kg. Por nivel de dosis, se asignó aleatoriamente una cohorte de 7 pacientes con dolor atribuido a artrosis de la rodilla (42 pacientes en total) en una proporción 6:1 a tratamiento activo o con placebo. A cada paciente se le administró una dosis única de PG110 o placebo por vía intravenosa durante un intervalo de 2 h en la mañana del Día 0 después de un desayuno ligero. Los pacientes permanecieron en la Unidad de Farmacología Clínica (UFC) hasta aproximadamente 24 h después del inicio de la infusión (Día 1) y regresaron para visitas en los Días 4, 7, 14, 21, 28, 56 y 84 del estudio.

- 20 **[0239]** Se tomaron muestras de sangre para ensayo de PG110 en el Día 0 (antes de la dosis, 1, 2, 3, 6 y 12 horas) y en los Días 1, 4, 7, 14, 21, 28, 56 y 84 después de la dosis. Se determinaron las concentraciones séricas de PG110 usando un ensayo ELISA validado. También se realizaron ensayos anti-PG110 en las muestras de los Días 0 (antes de la dosis), 14, 28, 56 y 84.

- 30 **[0240]** En el estudio se realizaron valoraciones farmacodinámicas, que incluyeron valoración del dolor por el paciente, cuestionario del Índice de Artrosis de Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC™), cuestionario del dolor de McGill, prueba de deambulación de 6 minutos, ecografía de la rodilla y PCR-as.

- 35 **[0241]** En la Tabla 12 se resumen los resultados preliminares de la valoración del dolor por el paciente. Como evaluación de la intensidad del dolor se usó una valoración del dolor por el paciente. Se pidió a los pacientes que puntuaran su respuesta en una VAS de 0-100 mm en la que 0 mm significa ausencia de dolor y 100 mm significa el peor dolor posible.

**Tabla 12. PG110 en pacientes con artrosis: valoración del dolor por el paciente (VAS)**

Tiempo (Día)	Valoración del dolor por el paciente (VAS, mm, cambio con respecto al valor de referencia) (Media ± DT)					
	Placebo	0,003 mg/kg	0,01 mg/kg	0,03 mg/kg	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg
4	-7,2 ± 13,1	-15,8 ± 23,0	-22,8 ± 28,6	-16,5 ± 17,5	-23,0 ± 17,6	-31,7 ± 18,2
7	-10,2 ± 12,1	-14,8 ± 23,4	-123 ± 25,9	-26,0 ± 17,2	-34,8 ± 20,3	-32,5 ± 18,2
14	-10,6 ± 14,3	-29,7 ± 15,8	-12,5 ± 21,7	-15,5 ± 22,7	-24,3 ± 28,3	0,5 ± 17,2
21	-11,2 ± 24,1	-30,5 ± 23,9	-16,3 ± 24,9	-25,5 ± 24,1	-23,3 ± 40,7	-20,0 ± 18,5
28	-9,6 ± 11,9	-28,3 ± 25,9	-16,5 ± 22,8	-30,7 ± 22,5	-45,2 ± 22,4	-35,3 ± 20,5
56	0,5 ± 15,0	-24,3 ± 25,8	-11,8 ± 19,8	-24,0 ± 19,8	-48,8 ± 23,7	-52,8 ± 19,3
84	-7,8 ± 16,4	-25,0 ± 20,7	-9,2 ± 18,2	-21,0 ± 23,2	-29,3 ± 37,1	-34,0 ± 26,0
Valoración máxima del dolor por el paciente (VAS, mm)	-22,4 ± 13,0	-41,0 ± 14,5	-30,2 ± 25,3	-37,2 ± 17,7	-48,8 ± 23,7	-55,3 ± 13,7

5 [0242] Basándose en los datos farmacodinámicos preliminares, se observó una respuesta a la dosis aparente en el intervalo de dosis de PG110 de 0 a 0,3 mg/kg.

[0243] La semivida farmacológica se estimó basándose en el periodo de tiempo medio para mantener el efecto del fármaco (TMR para efecto del fármaco). Se calcula como la proporción entre el área de la curva de efecto-tiempo corregida según los valores de referencia del primer momento (ABCEM) y el efecto del fármaco acumulado corregido según los valores de referencia con el tiempo (área bajo la curva efecto-tiempo, ABCE):

$$\text{Semivida farmacológica} = \frac{ABCEM}{ABCE} = \frac{\int E(t)tdt}{\int E(t)dt}$$

15 [0244] Las semividas farmacológicas estimadas se resumen en la Tabla 13.

**Tabla 13. Semivida farmacológica para PG110**

	Dosis de PG110				
	0,003 mg/kg	0,01 mg/kg	0,03 mg/kg	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg
Semivida farmacológica (Media ± DT) (Día)	43,0 ± 7,5	30,9 ± 21,6	35,8 ± 17,9	42,7 ± 5,0	41,9 ± 5,4

20 [0245] La estimación de la semivida farmacológica se basó en datos recogidos hasta 84 días después de la dosis de PG110. Como seguía existiendo un efecto sostenido de PG110 en el Día 84, especialmente a 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg dosis, la semivida farmacológica media estimada para PG110 es de al menos 5-7 semanas, con un intervalo de al menos 4-8 semanas.

25 [0246] Los datos farmacodinámicos preliminares son coherentes con la dosis terapéutica proyectada (0,10 a 0,3 mg/kg o 7-21 mg). La semivida farmacológica preliminar sugiere que una dosificación cada 4-12 semanas puede ser eficaz.

#### Equivalentes

30 [0247] Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando sólo la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria descriptiva. Cualquier combinación de las realizaciones desveladas en las reivindicaciones dependientes se describe en la presente memoria descriptiva.

35 **RESUMEN DE LISTADO DE SECUENCIAS**



[0248]

SEQ ID NO: 1 (PG110 V<sub>H</sub>)

5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN  
NSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLVTVSS

SEQ ID NO: 2 (PG110 V<sub>L</sub>)

10

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDYI  
LTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 3 (PG110 V<sub>H</sub> CDR 1)

GFSLTNNNVN

15 SEQ ID NO: 4 (PG110 V<sub>H</sub> CDR 2)

GVWAGGATDYN SALKS

SEQ ID NO: 5 (PG110 V<sub>H</sub> CDR 3)

DGGYSSSTLYAMDA

20

SEQ ID NO: 6 (PG110 V<sub>L</sub> CDR 1)

RASEDIYNALA

SEQ ID NO: 7 (PG110 V<sub>L</sub> CDR 2)

25 NDTLHT

SEQ ID NO: 8 (PG110 V<sub>L</sub> CDR 3)

QHYFHIPRT

30 SEQ ID NO: 9 (región constante natural de IgG4 humana)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITFPAPVLQSSGLYSLSSVVTVP  
SSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVKDRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E VTCV VV

DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS  
RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 10 (región constante mutada de serina a prolina de IgG4 humana)

35

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITFPAPVLQSSGLYSLSSVVTVP  
SSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVKDRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP E VTCV VV  
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI  
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS  
RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 11 (PG110 secuencia de nucleótidos de cadena pesada completa, incluyendo secuencia de señal)

ATGGAATGGAGCTGGGTGTTCCCTGTTCTTCCCTGAGCGTGACCACCGGGCGTGACACAGCGAGGTGC  
 AGCTGGTCGAGAGCGGGCGGAGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGCAGCCTGAGGCTGTCCCTGCGCCGC  
 CAGCGGCTTCAGCCTGACCAACAACAACGTGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTG  
 GAATGGGTGGGCGGCGTGTGGGCCGGGGAGCCACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGT  
 TCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGA  
 GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGGCGGCTACAGCAGCAGCACCCCTGTACGCCATG  
 GACGCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGT  
 TCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA  
 GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGGGTGCAC  
 ACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGCCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCA  
 GCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCAGCAACACCAAGGT  
 GGACAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCCACCCTGCCCCCCATGCCAGCCCCCGAGTTCCTG  
 GCGGACCCTCCGTGTTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC  
 CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCAGAGGTCCAGTTCAACTGGTA  
 CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTTAAACAGCACC  
 TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT  
 GCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCAGCTCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA  
 GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCACCCTCCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG  
 TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG  
 GCCAGCCCCGAGAACAATAACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCCT  
 GTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTG  
 ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGAGCCTGGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 12 (PG110 secuencia de aminoácidos de cadena pesada completa, incluyendo secuencia de señal)

5

MEWSWVLFFLSVTTGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSLSAASGFSLTNNNVNWRQAPGKLEWVGGVWA  
 GGATDYNALKSRFTISRDNKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLVTVSSAST  
 KGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS  
 LGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEFELGGPSVFLFPPKPKDTLMIKSRTEPEVTCVVVDVS  
  
 QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKA  
 KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT  
 VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK

SEQ ID NO: 13 (PG110 secuencia de aminoácidos de cadena pesada madura, excluyendo secuencia de señal)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFTISRDN  
NSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST  
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKV  
DKRVESKYGPPCPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVITCVVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN  
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM  
TRNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 14 (PG110 secuencia de nucleótidos de cadena ligera completa, incluyendo secuencia de señal)

ATGAGCGTGCCACCCAGGTGCTGGGCGCTGCTGCTGCTGCTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACA  
TCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTG  
CAGGGCCAGCGAGGACATCTACAACGCCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCC  
AAGCTGCTGATCTACAACACCGACACCCCTGCACACCGGCGTGCCAGCAGGTTACGCGGCAGCG  
GCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTT  
TTGCCAGCACTACTTCCACTACCCAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGG  
ACCGTGGCTGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCG  
CCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA  
CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC  
TACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCT  
GCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGGCGAGTGTG

5

A

SEQ ID NO: 15 (PG110 secuencia de aminoácidos de cadena ligera completa, incluyendo secuencia de señal)

MSVPTQVLGLLLLWLT DARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTD  
TLHTGVPSRFRSGSGSDTYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ  
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEV  
THQGLSSPVTKSFNRGEC

10

SEQ ID NO: 16 (PG110 secuencia de aminoácidos de cadena ligera madura, excluyendo secuencia de señal)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFRSGSGSDTYT  
LTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA  
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15 LISTADO DE SECUENCIAS

**[0249]**

<110> PANGENETICS 110, BV

20

<120> ANTICUERPOS CONTRA FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF) CON ESTABILIDAD *IN VIVO* MEJORADA

<130> PNJ-013PC

<140> Nueva solicitud

<141> Adjunta de forma concurrente

5

<150> 61/252.314

<151> 2009-10-16

<150> 61/252.813

10 <151> 2009-09-01

<150> 61/227.251

<151> 2009-07-21

15 <150> 61/172.228

<151> 2009-05-04

<160> 16

20 <170>

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<211> fuente

<212> PRT

30 <213> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 1

**Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**  
**115 120**

35

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

45 <400> 2

ES 2 514 319 T3

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

<210> 3

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 3

Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn Asn Val Asn  
 1 5 10

15

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 4

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

<210> 5  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

10 <400> 5

**Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala**  
**1 5 10**

<210> 6  
 15 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 20 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 6

**Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala Leu Ala**  
**1 5 10**

25

<210> 7  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

35  
 <400> 7

**Asn Thr Asp Thr Leu His Thr**  
**1 5**

40 <210> 8  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 8

50

**Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg Thr**  
**1 5**

<210> 9  
<211> 327  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5  
<400> 9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

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

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



ES 2 514 319 T3

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

<210> 10

<211> 327

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 10

ES 2 514 319 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1                   5                   10                   15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
          20                   25                   30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
          35                   40                   45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
      50                   55                   60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65                   70                   75                   80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
          85                   90                   95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 11  
<211> 1407  
<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

10

<400> 11

ES 2 514 319 T3

atggaatgga gctgggtggt cctgtttcttc ctgagcgtga ccaccggcgt gcacagcag 60  
 gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagccag gcggcagcct gaggctgtcc 120  
 tgcgcccca gcggcttcag cctgaccaac aacaacgtga actgggtgcg gcaggcccca 180  
 ggcaagggcc tggaatgggt gggggcgtg tgggccgggg gagccaccga ctacaacagc 240  
 gccctgaaga gcaggttcac catcagcagg gacaacagca agaacaccgc ctacctgag 300  
 atgaacagcc tgagggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccagga cggcggctac 360  
 agcagcagca ccctgtacgc catggacgcc tggggccagg gcaccctggt gaccgtgagc 420  
 agcggccagca ccaagggccc cagcgtgttc ccctggccc cctgcagcag aagcaccagc 480  
 gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 540  
 tcctggaaca gcggagccct gaccagcggg gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 600  
 agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgcca gcagcagcct gggcaccaag 660  
 acctacacct gcaacgtgga ccacaagccc agcaacacca aggtggaaa gaggggtgag 720  
 agcaagtacg gccaccctg cccccatgc ccagcccccg agttcctggg cggaccctcc 780  
 gtgtttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccaggtg 840  
 acctgcgtgg tgggtggacgt gagccaggaa gatccagag tccagttcaa ctggtacgtg 900  
 gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagtt taacagcacc 960  
 tacaggggtg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020  
 aagtgcagg tctccaaca gggcctgcc agctccatcg agaaaacct cagcaaggcc 1080  
 aagggccagc cacgggagcc ccaggtgtac accctgccac cctcccagga agagatgacc 1140  
 aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct accccagcga catcgccgtg 1200  
 gagtgggaga gcaacggcca gcccagagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac 1260  
 agcgacggca gtttcttct gtacagcagg ctgaccgtgg acaagtccag gtggcaggaa 1320  
 ggcaacgtct ttagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag 1380  
 agcctgtccc tgagcctggg caagtga 1407

<210> 12

<211> 468

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

ES 2 514 319 T3

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly  
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu  
 35 40 45

Thr Asn Asn Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Val Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser  
 65 70 75 80

Ala Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr  
 85 90 95

Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met  
 115 120 125

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr  
 130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser  
 145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu  
 165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His  
 180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser  
 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys  
 210 215 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu  
 225 230 235 240

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu  
 245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 275 280 285

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr  
 305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser  
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr  
 420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 450 455 460

Ser Leu Gly Lys  
 465



<210> 13

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 13

ES 2 514 319 T3

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp  
 260 265 270

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285

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

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

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

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

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365

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

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

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

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

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

Lys

- <210> 14
- <211> 705
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 514 319 T3

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético"

5

<400> 14

atgagcgtgc ccaccaggt gctgggcctg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc	60
gacatccaga tgaccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagggtgacc	120
atcacctgca gggccagcga ggacatctac aacgccttgg cctggatatca gcagaagccc	180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac accgacacce tgcacaccgg cgtgcccagc	240
aggttcagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc	300
gaggacttcg ccacctactt ttgccagcac tacttccact accccaggac cttcggccag	360
ggcaccaagg tggagatcaa gaggaccgtg gctgccccca gcgtgttcat cttccccccc	420
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac	480
ccccgggagg ccaagggtgca gtggaagggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag	540
gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag cacoctgacc	600
ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc	660
ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gctga	705

10 <210> 15  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 15

20

ES 2 514 319 T3

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp  
 35 40 45

Ile Tyr Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser  
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe  
 100 105 110

His Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg  
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln  
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr  
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser  
 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys  
 195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro  
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

ES 2 514 319 T3

<210> 16

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10

<400> 16

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Asn Thr Asp Thr Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende:
  - 5 (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 4 y 5, respectivamente,
  - (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDR 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, y
  - 10 (iii) una región constante de IgG4 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.
2. El anticuerpo según la reivindicación 1 que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.  
15
3. El anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2 que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16.  
20
4. El anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo humanizado.
5. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-NGF según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un soporte farmacéuticamente aceptable.  
25
6. Un kit que comprende el anticuerpo anti-NGF según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
7. Un ácido nucleico que codifica la cadena pesada del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.  
30
8. El ácido nucleico según la reivindicación 7 que codifica además la cadena ligera del anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 7 u 8.  
35
10. El vector de expresión según la reivindicación 9 que comprende las SEQ ID NO: 11 y 14.
11. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión según la reivindicación 9 ó 10.
- 40 12. Un procedimiento de expresión de un anticuerpo anti-NGF según se define en la reivindicación 1 que comprende el cultivo de la célula hospedadora según la reivindicación 11.
13. Un anticuerpo anti-NGF según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en un procedimiento para el tratamiento del dolor.  
45
14. Uso del anticuerpo anti-NGF según una de las reivindicaciones 1 a 4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor.
15. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 13, o el uso según la reivindicación 14, en el que el dolor es dolor por artrosis.  
50
16. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 13, o el uso según la reivindicación 14, en el que el dolor es dolor lumbar crónico.



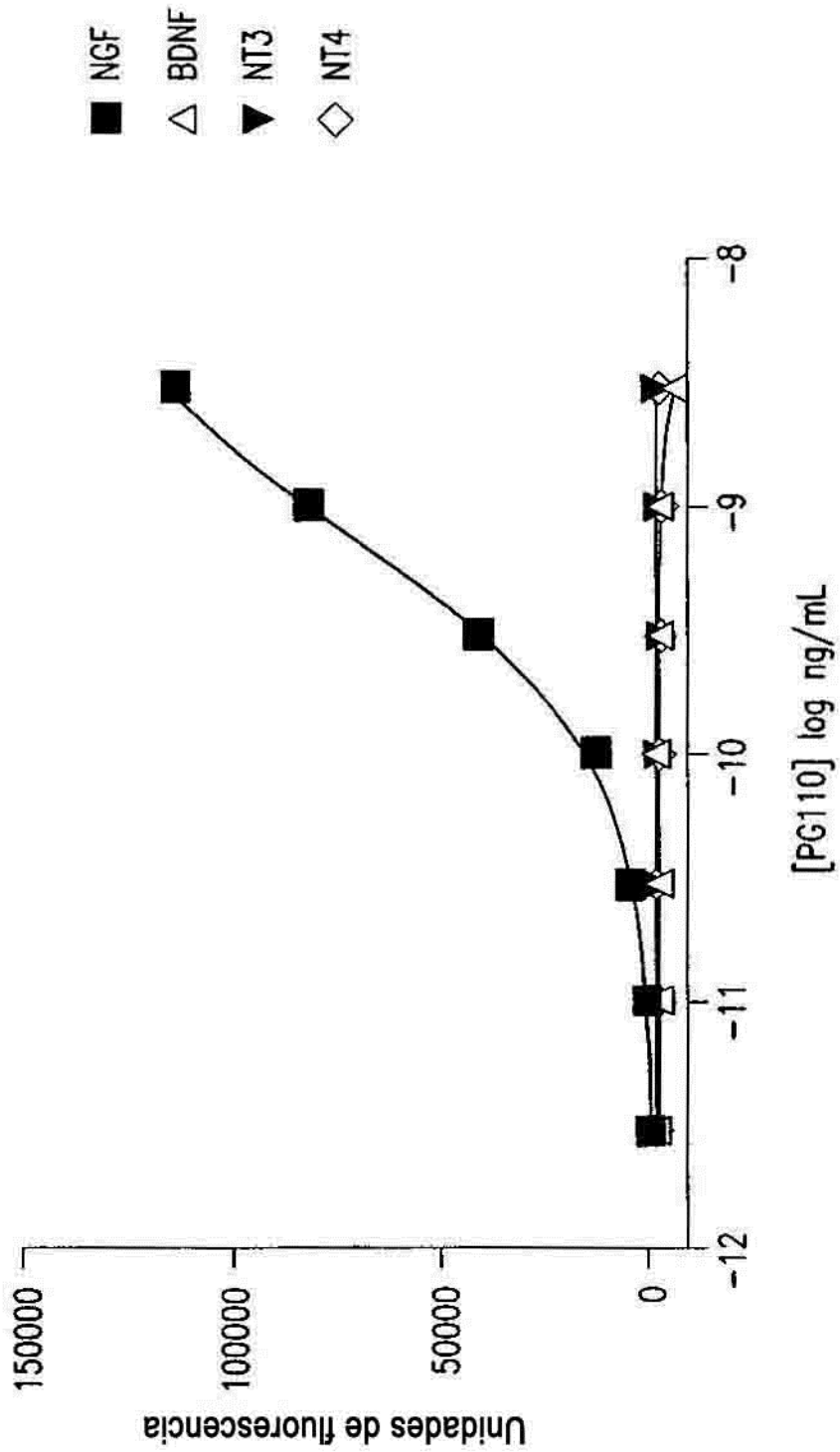


FIG.1

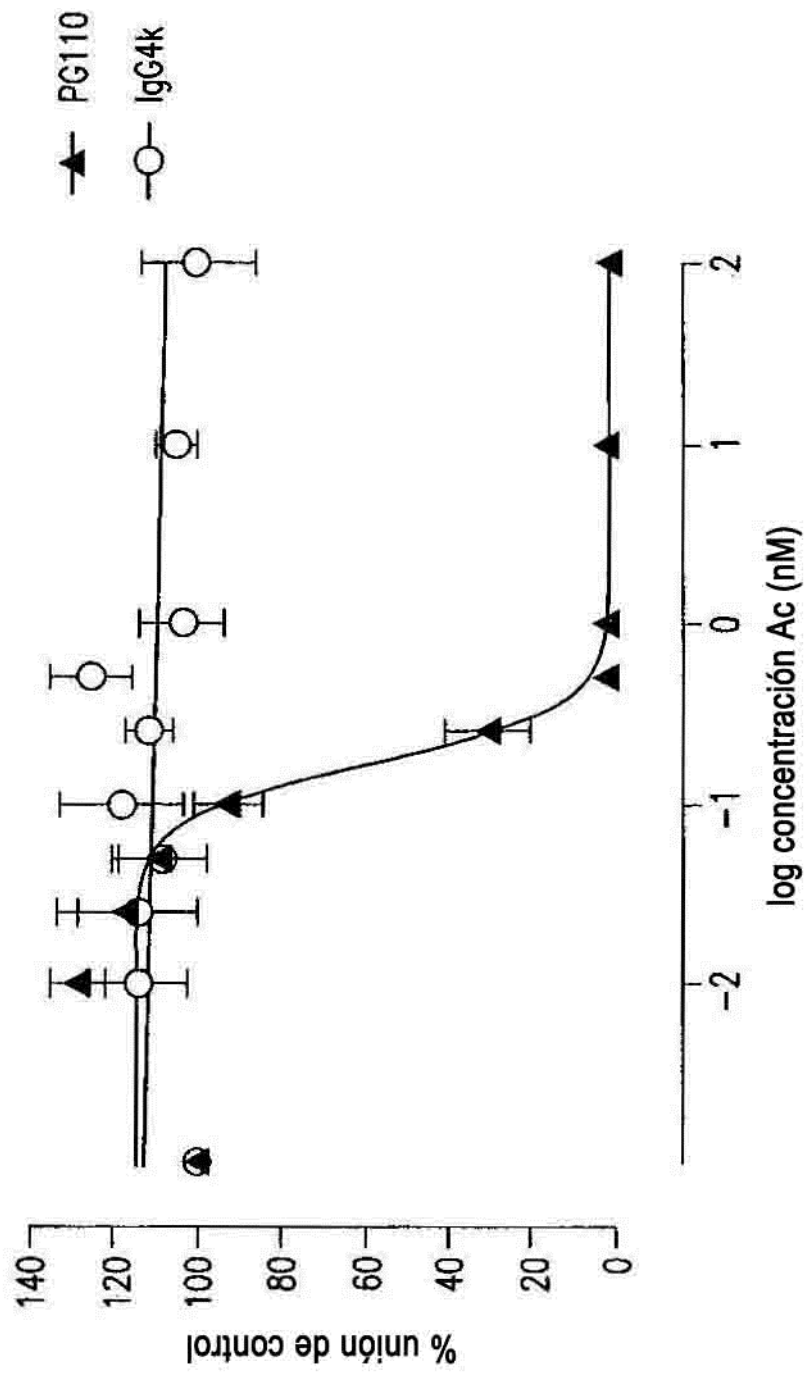


FIG.2A

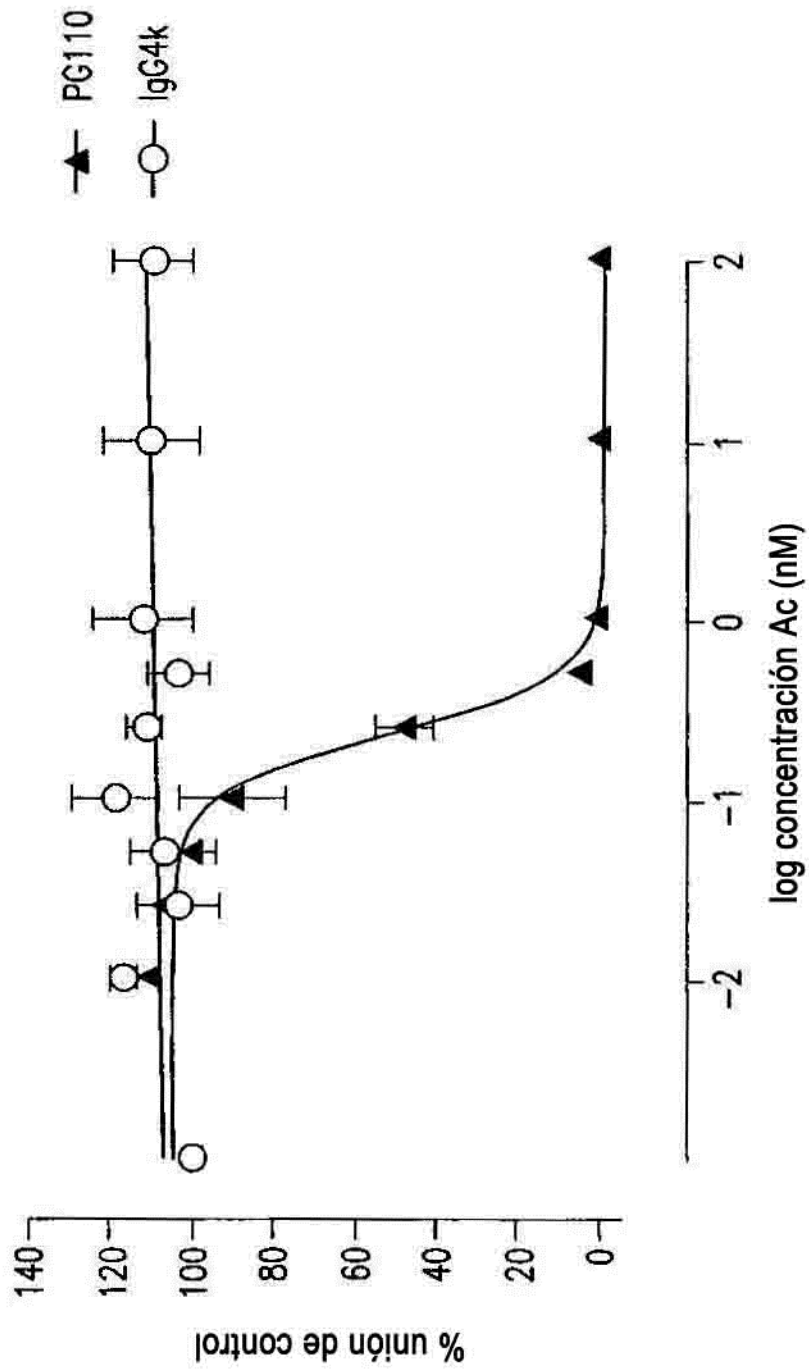


FIG.2B

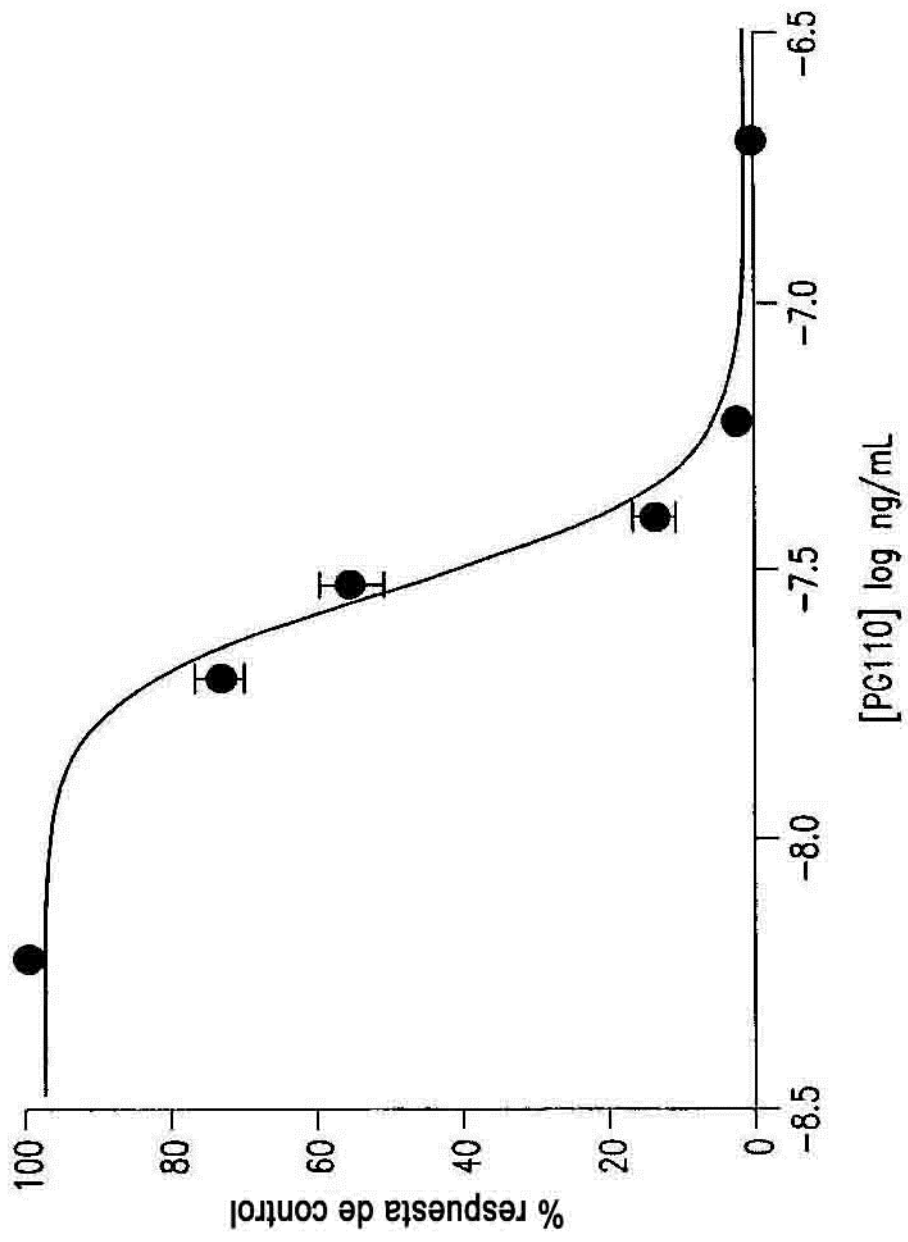


FIG.3A

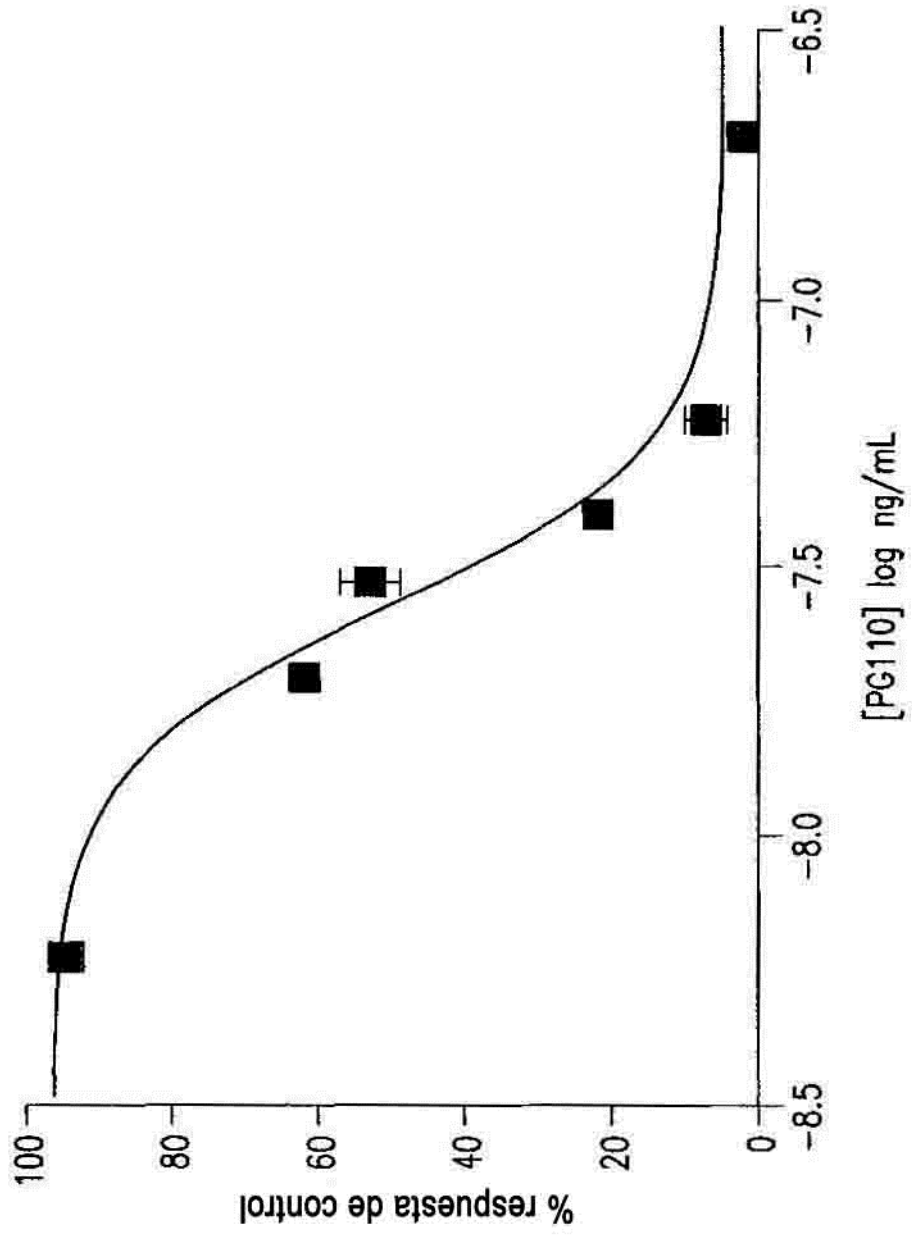


FIG.3B

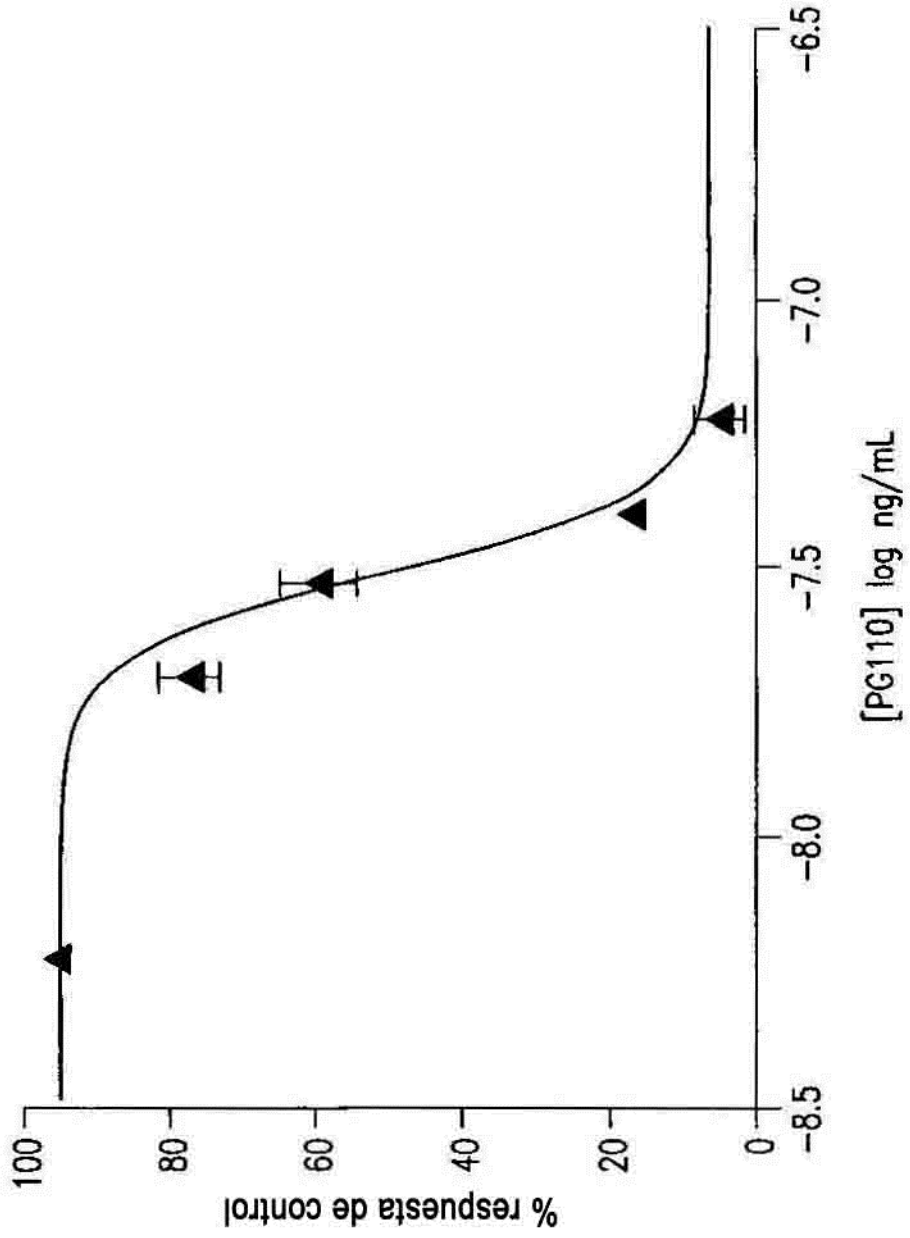
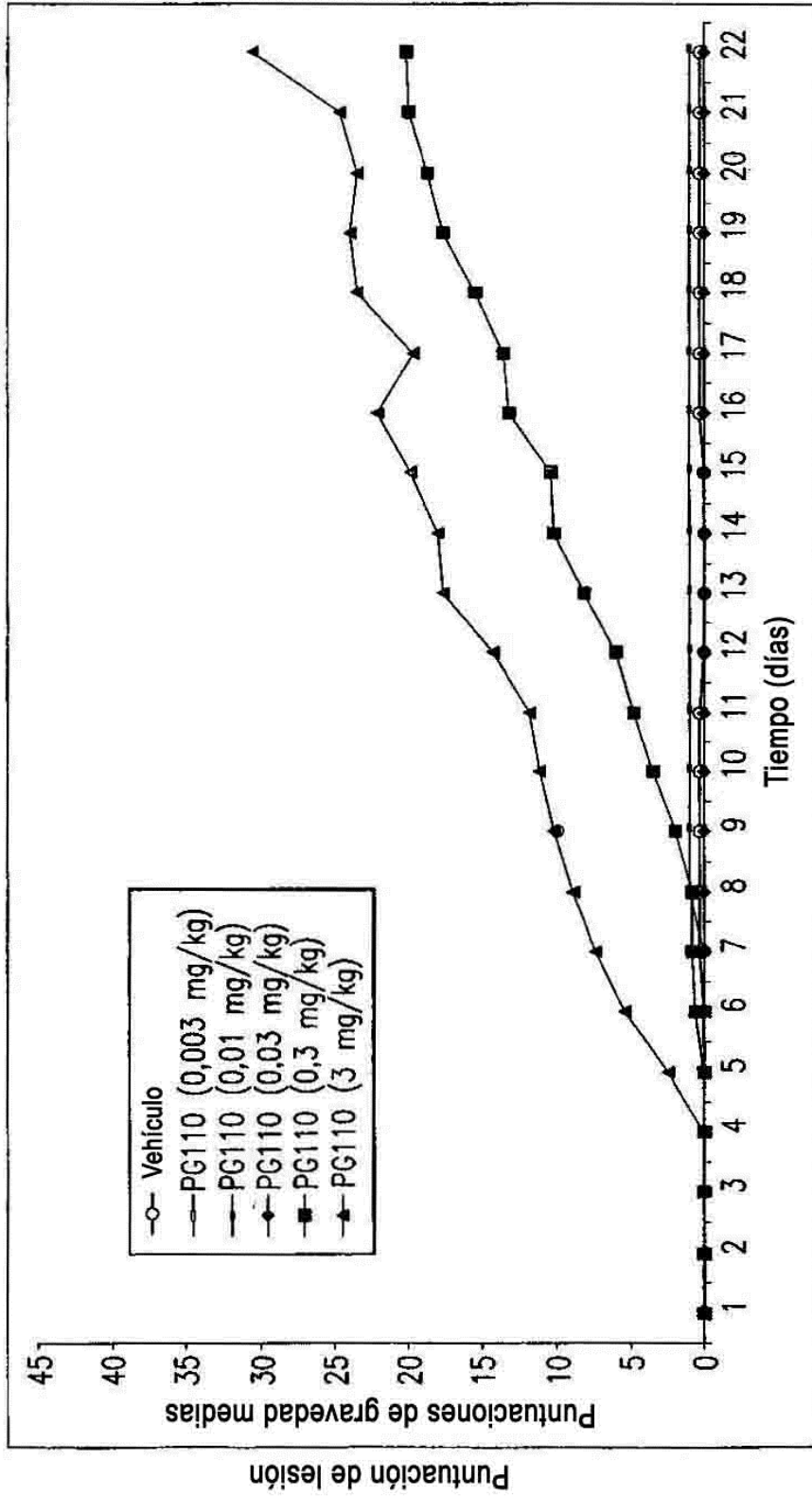


FIG.3C



Puntuación de lesión = número x área (mm<sup>2</sup>)

FIG.4