

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 758**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2005** **E 10151672 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 2206728**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento del dolor de cáncer de hueso mediante administración de un anticuerpo antagonista del factor de crecimiento neuronal**

30 Prioridad:

07.04.2004 US 560781 P

19.10.2004 US 620654 P

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

27.04.2018

73 Titular/es:

RINAT NEUROSCIENCE CORP. (50.0%)

230 East Grand Avenue

South San Francisco, CA 94080, US y

REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA (50.0%)

72 Inventor/es:

SHELTON, DAVID L. y

MANTYH, PATRICK WILLIAM

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 665 758 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

Procedimientos de tratamiento del dolor de cáncer de hueso mediante administración de un anticuerpo antagonista del factor de crecimiento neuronal

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al uso de un antagonista del factor de crecimiento neuronal (NGF) para la prevención, mejora, o tratamiento de dolor de cáncer de hueso.

Antecedentes de la invención

- 10 El factor de crecimiento neuronal (NGF) fue la primera neurotropina que se identificó, y su papel en el desarrollo y la supervivencia de tanto las neuronas periféricas como centrales se han caracterizado bien. NGF se ha mostrado que es un factor crítico de supervivencia de y mantenimiento en el desarrollo de las neuronas simpáticas y embrionarias periféricas y de las neuronas colinérgicas del prosencéfalo basales (Smeyne, y col, Nature 368: 246 - 249 (1994); Crowley, y col, Cell 76: 1001 - 1011 (1994)). NGF regula hacia arriba la expresión de los neuropéptidos en las neuronas sensoriales (Lindsay, y col, Nature 337: 362 - 364 (1989)), y su actividad está mediada por a través de dos receptores de unión a membrana diferentes, el receptor de la tirosina quinasa TrkA y el receptor p75 que está estructuralmente relacionado con los otros miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (Chao, y col., Science 232: 518 - 521 (1986)).

- 15 Además de sus efectos en el sistema nervioso, NGF ha estado en gran medida implicado en los procesos del exterior del sistema nervioso. Por ejemplo, NGF se ha mostrado que potencia la permeabilidad vascular en la rata (Otten, y col, Eur J Pharmacol. 106: 199 - 201 (1984)), potencian las respuestas inmunes de las células T- y B- (Otten, y col, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 86: 10059 - 10063 (1989)), inducen la diferenciación de linfocitos y proliferación de células de mastocitos y provocan la liberación de las señales biológicas solubles a partir de las células de mastocitos (Matsuda, y col, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85: 6508 - 6512 (1988); Pearce, y col, J. Physiol. 372: 379 - 393 (1986); Bischoff, y col, Blood 79: 2662 - 2669 (1992); Horigome, y col, J. Biol. Chem. 268: 14881 - 14887 (1993)). Aunque el NGF añadido exógenamente se ha mostrado que es capaz de tener todos estos efectos, es importante indicar que solamente se ha mostrado raramente que el NGF endógeno es importante en cualquiera de estos procesos *in vivo* (Torcia, y col, Cell. 85 (3): 345 - 56 (1996)). Por lo tanto, no está claro que el efecto pueda ser, si lo hay, de inhibición de la bioactividad del NGF endógeno.

- 20 El NGF se produce mediante un número de tipos de células que incluyen células de mastocitos (Leon, y col, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 91: 3739 - 3743 (1994)), linfocitos B (Torcia, y col, Cell 85: 345 - 356 (1996)), queratinocitos (Di Marco, y col, J. Biol. Chem. 268: 22838 - 22846)), células del músculo liso (Ueyama, y col, J. Hypertens. 11: 1061 - 1065 (1993)), fibroblastos (Lindholm, y col, Eur. J. Neurosci. 2: 795-801 (1990)), células epiteliales bronquiales (Kassel, y col, Clin. Exp. Allergy 31: 1432 - 40 (2001)), células mesangiales renales (Steiner, y col, Am. J. Physiol. 261:F792 - 798 (1991)) y miotubos del músculo esquelético (Schwartz, y col, J Photochem, Photobiol. B 66: 195 - 200 (2002)). Se ha encontrado receptores de NGF sobre una diversidad de tipos de células en el exterior del sistema nervioso. Por ejemplo, TrkA se ha encontrado sobre monocitos humanos, linfocitos T- y B2 y células de mastocitos.

- 25 Una asociación entre los niveles elevados de NGF y una diversidad de afecciones inflamatorias se ha observado en pacientes humanos así como en varios modelos de animales. Éstos incluyen lupus sistémico eritematoso (Bracci-Laudiero, y col, Neuroreport 4: 563 - 565 (1993)), esclerosis múltiple (Bracci-Laudiero, y col, Neurosci. Lett. 147: 9 - 12 (1992)), psoriasis (Raychaudhuri, y col, Acta Derm. Venereol 78: 84 - 86 (1998)), artritis (Falcimi, y col, Ann. Rheum. Dis. 55: 745 - 748 (1996)), cistitis intersticial (Okragli, y col, J. Urology 161: 438 - 441 (1991)), asma (Braun, y col, Eur. J Immunol/ 28: 3240 - 3251 (1998)), pancreatitis, y prostatitis.

- 30 De manera consistente, un elevado nivel de NGF en los tejidos periféricos está asociado a la inflamación y se observa en numerosas formas de artritis. La sinovia de los pacientes afectados por artritis reumatoide expresa niveles altos de NGF mientras que en la sinovia no inflamada se ha reseñado NGF que es no detectable (Aloe, y col, Arch. Rheum. 35: 351 - 355 (1992)). Similares resultados se observaron en ratas con artritis reumatoide inducida experimentalmente (Aloe, y col, Clin. Exp. Rheumatol. 10: 203 - 204 (1992); Halliday y col, Neurochem. Res. 23: 919 - 22 (1998)). Se han reseñado niveles elevados de NGF en ratones artríticos transgénicos junto con, un incremento en el número de células de mastocitos (Aloe, y col, Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects 15: 139 - 143 (1993)).

- 35 El tratamiento con NGF exógeno conduce a un incremento de dolor y sensibilidad al dolor. Esto se ilustra por el hecho de que la inyección de NGF conduce a un incremento significativo de dolor y sensibilidad al dolor en ambos modelos animales (Lewin y col, J. Neurosci. 13: 2136 - 2148 (1993); Amann, y col, Pain 64, 323 - 329 (1996); Andreev, y col, Pain 63, 109 - 115 (1995)) y seres humanos (Dyck, y col, Neurology 48, 501 - 505 (1997); Petty, y col, Annals Neurol. 36, 244 - 246 (1994)). NGF parece actuar mediante múltiples mecanismos que incluyen la inducción de la neurotropina BDNF (Apfel, y col, Mol. Cell. Neurosci. 7(2), 134 - 142 (1996); Michael, y col, J. Neurosci 17, 8476 - 8490 (1997)) que a su vez cambia el procesamiento de la señal de dolor en la médula espinal (Hains, y col, Neurosci Lett. 320 (3), 125 - 8 (2002); Miletic, y col, Neurosci Lett. 319 (3), 137 - 40 (2002); Thompson, y col, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 96 (14), 7714 - 8 (1999)), induciendo cambios en las conexiones

periféricas y centrales de las neuronas sensoriales y otras neuronas que transmiten dolor en la médula espinal (Lewin, y col, European Journal of Neuroscience 6, 1903 - 1912 (1994); Thompson, y col, Pain 62, 219 - 231 (1995)), induciendo cambios en el crecimiento axonal (Lindsay, RM, J Neurosci. 8(7), 2394 - 405 (1988)) induciendo la expresión del receptor de bradiquinina (Peterson y col, Neuroscience 83: 161 - 168 (1998)), induciendo cambios en la expresión de genes responsables de la activación y conducción neuronal tales como canales de iones (Boettger, y col., Brain 125 (Pt 2), 252 - 63 (2002); Kerr, y col., Neuroreport 12 (14), 3077 - 8 (2001); Gould, y col., Brain Res 854 (1 - 2), 19 - 29 (2000); Fjell y col., J. Neurophysiol. 81 : 803 - 810 (1999)), potenciando el receptor relacionado con el dolor TRPV (Chuang, y col., Nature 411 (6840), 957 - 62 (2001); Shu y Mendell, Neurosci. Lett. 274: 159 - 162 (1999)) y provocando cambios patológicos en los músculos (Foster, y col., J Pathol 197(2), 245 - 55 (2002)). Muchos de estos cambios tienen lugar directamente sobre las neuronas sensoriales que transmiten dolor y aparentemente no dependen de la inflamación concomitante. Además, existen al menos otros dos tipos de células conocidos que responden a NGF y que pueden estar implicados en cambios en la sensación o sensibilidad de dolor. El primero de éstos, la célula de mastocitos, se ha reseñado que responde a NGF con desgranulación (Yan, y col., Clin. Sci. (Lond) 80: 565 - 569 (1991)) o, en otros estudios, provoca o incrementa la producción o liberación del mediador en colaboración con otros agentes (Pearce y Thompson, J. Physiol. 372: 379 - 393 (1986), Kawamoto, y col., J. Immunol. 168: 6412 - 6419 (2002)). Se ha mostrado claramente en la rata que las respuestas de dolor mediadas por NGF están al menos algo mediadas por células de mastocitos (Lewin, y col., Eur. J. Neurosci. 6: 1903 - 1912 (1994), Woolf, y col., J. Neurosci. 16: 2716 - 2723 (1996) aunque la relevancia potencial de esto se continúa mostrando en seres humanos. Las neuronas simpáticas primarias también se sabe que responden a NGF y que también están implicadas en la señalización del dolor (Aley, y col., Neuroscience 71: 1083 - 1090 (1996)). Es evidente que la eliminación de la innervación simpática modifica la hiperalgesia normalmente observada en respuesta al tratamiento con NGF (Woolf, y col, J. Neurosci. 16: 2716 - 2723 (1996)).

Se ha descrito el uso de antagonistas de NGF, tal como anticuerpo anti-NGF, para tratar diversos tipos de dolor. Véanse, por ejemplo los documentos U.S. Números de serie. 10/682.331, 10/682.638, 10/682.332 (Pub. N° 2004/0131615), 10/783.730 (Pub. N° 2004/0253244), 10/745.775 (Pub. N° 2004/0237124), 10/791.162; PCT/US03/32089 (documento WO 04/032870); PCT/US03/32083 (documento WO 2005/000194); PCT/US03/32113; PCT/US2004/05162 (documento WO 04/073653); PCT/US03/41252 (documento WO 04/058184).

El dolor de cáncer de hueso puede surgir en seres humanos a partir de o bien tumores de hueso primarios o de manera más común a partir de metástasis de hueso (tales como carcinomas de mama, próstata, y pulmón). Véase Luger y col., Pain 99: 397 - 406 (2002). Se ha desarrollado un modelo de ratón de dolor de cáncer de hueso, y este modelo de dolor de cáncer de hueso se refleja en el dolor observado en seres humanos con dolor de cáncer de hueso moderado a avanzado. Véase Luger y col., Pain 99: 397- 406 (2002); Clohisy y col., Clinical Orthopaedics and Related Research 415S S279-S288 (2003); Schwei y col., J. Neurosci. 19: 10886 - 10897 (1999); Honore y col., Nat. Med. 6: 521 - 529 (2000). Publicaciones de Honore y col. y Schwei y col. establecen que la marca neuroquímica de los cambios observados en la médula espinal y DRG de animales que tienen cáncer de hueso es único y distinguible de cualquier dolor inflamatorio típico o dolor neuropático típico aunque parecen ser componentes de esta marca bioquímica similar a los estados de dolor inflamatorios y neuropáticos clásicos en este modelo. Honore y col. Neuroscience 98: 585 - 598 (2000); Schwei y col. J. Neurosci. 19:10886-10897 (1999); Luger y col., Pain 99:397-406 (2002).

Jongen y col (Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner, Vol. 2002) desvela la expresión de NGF por la línea celular 2472 de sarcoma osteolítico *in vitro* e *in vivo*. El documento US5.147.294 desvela el tratamiento de mieloma múltiple con bloqueantes del nervio simpático y vincristina. El documento WO02/096458 y Hongo y col (Hybridoma, 2000; 19(3): 215-227) desvela anticuerpos anti-NGF monoclonales de ratón.

Breve resumen de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento que los antagonistas de NGF, tales como anticuerpo anti-NGF, son eficaces en el tratamiento de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso. El tratamiento se dirige a uno o más aspectos de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso como se describe en el presente documento.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un antagonista del factor de crecimiento neuronal (NGF) en la fabricación de un medicamento para tratar dolor de cáncer de hueso de moderado a grave en un individuo, en el que el antagonista de NGF es un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión de NGF humano a trkA y/o p75; y en el que el dolor de cáncer de hueso es de cáncer asociado a metástasis de hueso con actividad osteoblástica. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un AINE. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide y AINE. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un AINE.

En otro aspecto, la invención proporciona usos médicos para reducir la incidencia de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso, mejora de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso, paliación de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso; y / o retraso del desarrollo o progresión de dolor de cáncer de hueso incluyendo

dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso en un individuo, comprendiendo dichos procedimientos administrar una cantidad eficaz de un antagonista de NGF. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un AINE. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide and un AINE. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un AINE.

En algunas realizaciones, la metástasis de hueso es cáncer de próstata con metástasis al hueso. En algunas realizaciones, la metástasis de hueso es cáncer de mama con metástasis al hueso. En algunas realizaciones, la metástasis de hueso es cáncer de pulmón con metástasis al hueso. En algunas realizaciones, la metástasis de hueso es cáncer de riñón con metástasis al hueso. En algunas realizaciones, el dolor de cáncer tratado es grave.

Un antagonista de NGF adecuado para uso en el uso médico de la invención es un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión del NGF humano a *trkA* y/o *p75*. La divulgación proporciona otros antagonistas de NGF que puede directa o indirectamente dar como resultado la disminución de la actividad biológica de NGF. En algunas realizaciones, un antagonista de NGF (por ejemplo, un anticuerpo) se une a (interactúa físicamente con) NGF, se une a un receptor de NGF (tal como el receptor de *trkA* y/o *p75*) y/o reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor de NGF corriente abajo (por ejemplo, inhibidores de la señalización de quinasas). En consecuencia, en algunas realizaciones, un antagonista de NGF se une (interactúa físicamente) con el NGF. En otra realización, un antagonista de NGF se une a un receptor de NGF (tal como el receptor de *trkA* y/o *p75*). En otras realizaciones, un antagonista de NGF reduce (impide y/o bloquea) la señalización el receptor de NGF corriente abajo (por ejemplo, inhibidores de la señalización de quinasas). En otras realizaciones, un antagonista de NGF inhibe (reduce) la síntesis y/o la liberación de NGF. También descrito en el presente documento, el antagonista de NGF es una inmunoadhesina *TrkA*. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se une a NGF (tal como hNGF) y no se une de manera significativa a neurotrofinas relacionadas, tales como NT-3, NT4/5, y / o BDNF. También descrito en el presente documento el antagonista de NGF se selecciona de uno cualquiera o más de los siguientes: una molécula antisentido dirigida a un NGF (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica NGF), una molécula antisentido dirigida hacia un receptor de NGF (tal como *trkA* y/o *p75*) (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica un receptor de NGF), un compuesto inhibitorio de NGF, un análogo estructural de NGF, una mutación negativa dominante de un receptor *TrkA* y/o *p75* que se une a un NGF, un anticuerpo anti-*TrkA*, un anticuerpo anti-*p75* y un inhibidor de quinasas. En otras realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-NGF está humanizado (tal como anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es anticuerpo E3 (como se describe en el presente documento). En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende una o más CDR (s) de anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, o cinco, o en algunas realizaciones, las seis CDR de E3). En otras realizaciones, el anticuerpo es humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende tres CDR de la cadena pesada de E3. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende tres CDR de la cadena ligera de E3. En todavía otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en la Tabla 1 (SEO ID NO:1). En todavía otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en la Tabla 2 (SEQ ID NO:2). En todavía otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no desencadena la lisis mediada por complemento, o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613 - 2624; Solicitud PCT N° PCT/GB99/01441; y / o la Solicitud de Patente de Reino Unido N° 9809951.8.

En algunas realizaciones, el antagonista de NGF es un anticuerpo que se une de manera específica a NGF (tal como NGF humano). En todavía otras realizaciones, el anticuerpo se une de manera esencial al epítipo 6 de NGF como un anticuerpo seleccionado entre uno o más de los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón: Mab 911, MAb 912 y MAb 938 (Véase Hongo, y col., Hybridoma 19: 215 - 227 (2000)). Como se describe en el presente documento, el antagonista NGF se une al receptor *TrkA*. El anticuerpo antagonista anti-NGF puede ser un anticuerpo monoclonal anti-humano NGF (anti-hNGF) que es capaz de unirse a hNGF e inhibir de manera eficaz la unión de hNGF a *TrkA* humana (h*TrkA*) y / o inhibir de manera eficaz la activación del receptor *TrkA* humano.

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

de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM, o menos de aproximadamente 50 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es menos de cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM. En todavía otras realizaciones, la afinidad de unión es aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM, o mayor de aproximadamente 40 pM. Como se conoce bien en la técnica, la afinidad de unión se puede expresar como K_D , o constante de disociación, y una afinidad de unión aumentada corresponde a una K_D disminuida. La afinidad de unión de anticuerpo monoclonal 911 anti-NGF de ratón (Hongo y col., Hybridoma 19: 215 - 227 (2000) para NGF humanos es aproximadamente 10 nM, y la afinidad de unión de anticuerpo humanizado anti-NGF E3 (descrito en el presente documento) para NGF humano es aproximadamente 0,07 nM. Las afinidades de unión de anticuerpo 911 y E3 se midieron usando sus fragmentos Fab.

El antagonista de NGF puede administrarse antes de, durante, y/o después que un individuo se haya diagnosticado con cáncer de hueso o cáncer que tiene metástasis al hueso. La administración de un antagonista de NGF puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo: por vía oral, intravenosa, subcutánea, intraarterial, intramuscular, intracardiaca, intraespal, intratorácica, intraperitoneal, intraventricular, sublingual, y / o transdérmica. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF es un anticuerpo anti-NGF y la administración es mediante uno o más de los siguientes medios: intravenosa, subcutánea, mediante inhalación, intraarterial, intramuscular, intracardiaca, intraventricular, e intraperitoneal. La administración puede ser sistémica, por ejemplo intravenosa, o localizada.

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

La divulgación también ofrece una composición para tratar y / o prevenir dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso que comprende una cantidad eficaz de un antagonista del factor de crecimiento neuronal (NGF), en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En alguna divulgación, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide. En alguna divulgación, el antagonista de NGF se co-administra con un AINE. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF es un anticuerpo que se une de manera específica a la molécula de NGF. En otra divulgación, el antagonista de NGF es cualquier antagonista descrito en el presente documento.

También se desvela en el presente documento un kit para su uso en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En alguna divulgación, el kit comprende cualquiera de los antagonistas de NGF descritos en el presente documento, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra divulgación, el kit comprende además instrucciones para su uso del antagonista de NGF en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra el dolor continuado como se establece por la rigidez espontánea y el estremecimiento espontáneo durante un período de observación de 2 min el día 10 y el día 14 después de la inyección de sarcoma. "No expuesto" se refiere a animales sin ninguna inyección. "Tratados de forma simulada + veh." Se refiere a animales inyectados con medio esencial mínimo α en la cavidad de la médula de fémur y más tarde inyectado con solución salina. "Sarc + veh." se refiere a animales inyectados con sarcoma en la cavidad de la médula del fémur y más tarde inyectado con solución salina. "Sarc + Anti-NGF" se refiere a animales inyectados con sarcoma en la cavidad de la médula del fémur y más tarde inyectado con anticuerpo anti-NGF 911.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el dolor ambulatorio como se determina por el uso del miembro y rigidez ambulatoria forzada (rotarod) el día 10 y el día 14 después de la inyección de sarcoma. "No expuesto" se refiere a animales sin ninguna inyección. "Tratados de forma simulada + veh." se refiere a animales inyectados con medio esencial mínimo α en la cavidad de la médula del fémur y más tarde inyectado con solución salina. "Sarc + veh." se refiere a animales inyectados con sarcoma en la cavidad de la médula del fémur y más tarde inyectado con solución salina. "Sarc + AntiNGF" se refiere a animales inyectados con sarcoma en la cavidad de la médula del fémur y más tarde inyectado con anticuerpo anti-NGF 911.

La Figura 3 es un gráfico que muestra dolor provocado por tocamiento como se determina mediante rigidez inducida por palpación y estremecimiento inducido por palpación durante un período de observación de 2 min el día 10 y el día 14 después de la inyección de sarcoma. "No expuesto" se refiere a animales sin ninguna inyección. "Tratados de forma simulada + veh." se refiere a animales inyectados con medio esencial mínimo α en la cavidad de la médula del fémur y más tarde inyectado con solución salina. "Sarc + veh." se refiere a animales inyectados con sarcoma en la cavidad de la médula del fémur y más tarde inyectado con solución salina. "Sarc + Anti-NGF" se refiere a animales inyectados con sarcoma en la cavidad de la médula del fémur y más tarde inyectado con anticuerpo anti-NGF 911.

La Figura 4 muestra fotografías que demuestran que el anticuerpo anti-NGF no tenía efecto en la progresión de la enfermedad en hueso el día 14 (d14) después de la inyección de tumor. Animales tratados de forma simulada (n = 8), vehículo proporcionado (tratados de forma simulada más vehículo), se muestran en (a) y (d); animales inyectados con sarcoma (transfectados con GFP) (n = 13), vehículo proporcionado (sarcoma + vehículo) se muestran en (b) y (e); animales inyectados con sarcoma (transfectados con GFP) (n = 8), proporcionado el anticuerpo anti-NGF (sarcoma + anti-NGF), se muestran en (c) y (f). Figuras 4a, 4b, y 4c son radiografías que muestran la presencia o ausencia de, destrucción de hueso. Figuras 4d, 4e, y 4f son fotografías que muestran la inmunotinción con anticuerpo anti-GFP. Barras de escala de: 1 mm.

La Figura 5 muestra fotografías que demuestran que el tratamiento con anticuerpo anti-NGF no tenía ningún efecto observable sobre la inervación sensorial en la piel. Muestras de piel de la pata trasera de ratones tanto inyectados con sarcoma (a, b) y no expuestos (c, d) se inmunotifieron para el neuropéptido péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), que marca fibras nerviosas sensoriales peptidérgicas no mielinizadas. Inmunotinción de CGRP muestras de piel de la pata trasera de ratones inyectados con sarcoma y tratados con vehículo (a, n = 3), ratones inyectados con sarcoma y tratados con anticuerpo anti-NGF (b, n = 8), ratones no expuestos y tratados con vehículo (c, n = 8), y ratones no expuestos y tratados con anticuerpo anti-NGF (d, n = 8) se muestran. Barra de escala: 50 μ m.

La Figura 6 muestra gráficos que demuestran que el tratamiento con anti-NGF atenuaba el dolor de cáncer de hueso. La rigidez gastada con el tiempo y el número de estremecimientos espontáneos del miembro inyectado con sarcoma durante un período de observación de dos minutos 2 se usó como una medición del dolor continuado, 8, 10, 12 y 14 días después de la inyección y confinamiento de células de sarcoma al fémur izquierdo (a, b). Parámetros de dolor provocado por movimiento incluía la cuantificación de la rigidez gastada con el tiempo y el número de estremecimientos durante un período de observación de 2 minutos después de una palpación normalmente no nociva del fémur inyectado por sarcoma (c, d). "#" indica $P < 0,05$ vs. tratados de forma simulada más vehículo; y "****" indica $P < 0,05$ vs. sarcoma + vehículo.

La Figura 7 muestra gráficos que demuestran que el tratamiento con anti-NGF no tenía efecto sobre los umbrales térmicos o mecánicos de línea base y tenían una mayor eficacia que la morfina (MS) en la reducción del dolor de cáncer de hueso. Figuras 7a y 7b muestran la sensibilidad térmica (a, n = 8 para no expuesto +vehículo, n = 8 para no expuesto + anti-NGF) medido mediante latencia de la retirada de la pata trasera a un estímulo térmico y sensibilidad mecánica (b, n = 8 para no expuesto + vehículo, n = 8 para no expuesto + anti-NGF) medido mediante un umbral del 50% de la estimulación mecánica de tratamiento anti-NGF (10 mg/kg, i. p., cada 5 días) en ratones no expuestos. Figuras 7c y 7d muestran los comportamientos de dolor continuado evaluados mediante la medición de rigidez espontánea (c) durante un período de observación de 2 minutos, y dolor provocado por el movimiento determinado mediante la medición de la rigidez gastada con el tiempo (d) durante un período de observación de 2 minutos después de la palpación normalmente no nociva del fémur distal. Se muestran los valores de los ratones de rigidez espontánea (c) rigidez inducida por palpación (d) para no expuestos, tratados de forma simulada y tratados con vehículo, inyectados con sarcoma y tratados con vehículo, inyectados con sarcoma y tratados con morfina (n = 8, 10 mg/kg i. p. administrada 15 min antes del ensayo), e inyectados con sarcoma y tratados con morfina (n = 8, 30 mg/kg i. p. administrada 15 min antes del ensayo), e inyectados con sarcoma y tratados con anticuerpo anti-NGF (n = 8, 10 mg/kg, cada 5 días, i. p. administrada entre 6 días a 14 días después de la inyección del tumor) se muestran. Las barras de error representan T. E. M. "#" indica $P < 0,05$ vs. tratados de forma simulada más vehículo (n = 8); "****" indica $P < 0,05$ vs. sarcoma + vehículo; y "+" indica $P < 0,05$ vs. sarcoma + morfina.

La Figura 8 muestra fotografías que demuestran que el tratamiento con anticuerpo antagonista anti-NGF redujo los cambios neurológicos e infiltración de macrófagos en los ganglios de la raíz dorsal (DRG) de animales que tienen tumor. Figuras 8a y 8b muestran la tinción inmunofluorescente del factor-3 de activación de transcripción (ATF-3) en el L2 DRG ipsilateral de los animales tienen tumor tratados con vehículo (a, n = 8) y tratados con anticuerpo anti-NGF (b, n = 8) catorce días después de la implantación de tumor. El panel inferior muestra la tinción inmunofluorescente de CD-68 que indica la intensidad de los macrófagos activados y de infiltración alrededor de las neuronas sensoriales lesionadas dentro del DRG ipsilateral de animales que tienen tumor tratados con vehículo (c, n = 7) y tratados con anticuerpo antiNGF (d, n = 7). Barras de escala a-d = 5 μ m.

La Figura 9 muestra micrografías que demuestran que los cambios neuroquímicos asociados a la sensibilización central estaban atenuados mediante administración de anti-NGF. Figuras 9A y 9B muestran la inmunotinción de dinorfina en el asta dorsal de la médula espinal de ratones inyectados con sarcoma y tratados con vehículo (A, n = 9) y ratones inyectados con sarcoma y tratados con anticuerpo anti-NGF (B, n = 4). Figuras 9C y 9D muestra imágenes confocales representativas de neuronas que expresan c-Fos de la médula espinal en ratones inyectados con sarcoma y tratados con vehículo (C, n = 4) y ratones inyectados con sarcoma y tratados con anticuerpo anti-NGF (D, n = 4) después de una palpación normalmente no nociva de miembros que tienen tumor. Barra de escala: 150 μ m para A and B; 200 μ m para C and D.

La Figura 10 muestra gráficos que demuestran que la terapia de anti-NGF atenuaba el dolor de cáncer de hueso inducido por tumor de próstata. Tratamiento anti-NGF (10 mg/kg, i. p., proporcionado los días 7, 12, y 17 después de la inyección de tumor) atenuaba los comportamientos de dolor continuado de cáncer que comienza el día 7 después de la inyección del tumor a lo largo de la progresión de la enfermedad. La rigidez gastada con el tiempo y número de estremecimientos en fémures inyectados con ACE-1 durante un período de observación de 2 minutos se usaron como mediciones de dolor continuado (A, B). Anti-NGF (cuadro lleno) reducía de manera significativa los comportamientos del dolor continuado en animales inyectados por tumor cuando se compara ACE-1 + vehículo (cuadro abierto), y se redujo hasta cerca de los niveles de los tratados de forma simulada el

día 9 para todos los parámetros (círculo). Tanto la rigidez como estremecimiento en los animales tratados de forma simulada más vehículo eran significativamente diferentes de ACE-1 + vehículo a través de la progresión de la enfermedad. Tratamiento anti-NGF no tenía efecto sobre las respuestas basal térmicas o mecánicas basales como se mide mediante la latencia de la retirada de la pata a un estímulo térmico o se incrementa en el umbral de la estimulación mecánica (C, D). El tratamiento de Anti-NGF produjo una mayor reducción en los comportamientos del dolor continuado el día 19 que 10 mg/kg o 30 mg/kg de morfina (i.p., 15 min antes del ensayo) (E, F). El dolor provocado por el movimiento se midió mediante la cuantificación de rigidez gastada con el tiempo y el número de estremecimientos durante un período de observación de 2 minutos después de una palpación normalmente no nociva del fémur inyectado con ACE-1 (G, H). Las barras de error representan E. T. M. For Fig. 10A-F, "#" indica $P < 0,05$ vs. tratados de forma simulada más vehículo; "*" indica $P < 0,05$ vs. ACE-1 + vehículo; y "+" indica $P < 0,05$ vs. ACE-1 + morfina. Para la Fig. 10G y 10H, "***" indica $P < 0,01$ vs. de forma simulada; y "#" indica $P < 0,01$ vs. ACE-1 + vehículo.

La Figura 11 son fotografías que demuestran que el tratamiento de anticuerpo anti-NGF no tenía efecto sobre la carga de tumor o renovación del hueso inducido por tumor. Los animales de forma simulada, proporcionados vehículo, (A) no mostraron radiográficamente o histológicamente (H&E) (D) destrucción evidente de hueso el día 19, mientras que los animales ACE-1 + vehículo (B, E) y ACE-1 + anti-NGF (C, F) mostraron crecimiento de tumor significativo y renovación del hueso cuando se examinan radiográficamente e histológicamente. H = células hematopoyéticas; T = tumor; WB= formación de hueso inducida por ACE-1; Barra de escala = 1,5 mm.

La Figura 12 son imágenes que demuestran que la terapia de anti-NGF no reducía de manera significativa la osteoclastogénesis inducida por tumor. Las imágenes teñidas de TRAP de tratados de forma simulada más vehículo (A), ACE-1 + vehículo (B), y ACE-1 + anti-NGF (C) ilustran que la proliferación ocurrida en este modelo junto con las regiones de renovación de hueso inducida por tumor con un incremento en el número de osteoclastos por mm^2 de área intramedular diafisial tanto en los animales tratados con anti-NGF como vehículo cuando se compara con animales tratados de forma simulada más vehículo y no expuesto + vehículo. No existía diferencia observable en la aparición histológica de los osteoclastos junto con la interfase tumor/hueso o macrófagos en todas las partes del tumor cuando los animales tratados con anti-NGF (C) se compararon con los animales tratados con vehículo (B). Los animales tratados de forma simulada más vehículo (A) presentaban números de osteoclastos y morfología, y macrófagos que no eran significativamente diferentes de los animales no expuestos. Flechas = osteoclastos; Punta de flechas = macrófagos; MB = hueso mineralizado; H = células hematopoyéticas; T= tumor; Barra de escala: 50 μm .

La Figura 13 son fotografías que demuestran que la terapia de anti-NGF no influenciaban la densidad de las fibras sensoriales inmunorreactivas del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP-IR) en el fémur. No existía diferencia observable en los niveles de inmunofluorescencia o densidad de fibras de CGRP-IR entre animales ACE-1 + vehículo (A) y animales ACE-1 + antiNGF (B). También hay que indicar que existía mantenimiento de fibras de CGRP-IR con terapia de anti-NGF. T= tumor; Barra de escala: 50 μm .

La Figura 14 son fotografías que demuestran que terapia de anti-NGF no influenciaba la densidad de las fibras sensoriales inmunorreactivas del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP-IR) en la piel de la pata trasera. No existía diferencia observable en los niveles de inmunofluorescencia o densidad de fibras de CGRP-IR en la piel entre ratones no expuestos + vehículo (A) y ratones no expuestos + anti-NGF (B) ratones existe. De manera similar, no existía diferencia en los niveles de inmunofluorescencia o densidad de fibras nerviosas de CGRPIR entre animales de ACE- 1 + vehículo (C) y animales de ACE-1 + anti-NGF (O). También hay que indicar que no existía diferencia en las fibras nerviosas de CGRP-IR entre los ratones no expuestos y los ratones inyectados con ACE-1 (A, B vs. C, O). Barra de escala: 50 μm .

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento que la administración *in vivo* de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de NGF tal como monoclonal anticuerpo anti-NGF se puede usar para tratar dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso. La invención se basa en observaciones en un modelo de cáncer de hueso de ratón en el que la administración de anticuerpo antagonista anti-NGF es notablemente eficaz en la reducción de tanto el dolor de cáncer de hueso continuado como el provocado por el movimiento.

La invención destaca usos médicos para tratar dolor de cáncer de hueso moderado a grave a partir de metástasis a hueso con actividad osteoblástica en un individuo (tanto humano como no humano) mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF, por ejemplo un anticuerpo monoclonal anti-humano NGF (anti-hNGF). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se co-administra con un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se co-administra con un AINE. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF no se co-administra con un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF no se co-administra con un AINE.

En otro aspecto, la invención proporciona usos médicos para la mejora, retraso del desarrollo de y / o prevención de la progresión de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso que comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de NGF a un individuo. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un AINE. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un

AINE.

La divulgación también ofrece composiciones y kits para tratar dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso que comprende un antagonista de NGF tal como un anticuerpo anti-NGF, por ejemplo un anticuerpo monoclonal anti-NGF, para uso en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es capaz de inhibir de manera eficaz la unión de NGF a su (sus) receptor (es) de TrkA y / o p75 y / o of inhibir de manera eficaz NGF de la activación de su receptor (es) de TrkA y / o p75.

Técnicas Generales

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tales como, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook, y col., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.1. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Ind.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mamífero Cells (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, y col., eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, y col., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan y col., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988 - 1989); Anticuerpos monoclonales : a practical approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Definiciones

Un "anticuerpo" (usado indistintamente en forma plural) es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse de manera específica a una diana, tales como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término abarca no solamente anticuerpos policlonales o monoclonales intactos sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadena única (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos bispecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tales como IgG, IgA, o IgM (o sub-clase del mismo), y el anticuerpo no necesita ser de cualquier clase particular. Dependiendo secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas se pueden además dividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa, delta, epsilon, gamma, y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones de tres dimensiones de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpo homogénea en la que el anticuerpo monoclonal está constituido por aminoácidos (de origen natural y de origen no natural) que están implicados en la unión selectiva de un antígeno. Una población de anticuerpos monoclonales es altamente específica, estando dirigida contra un sitio antigénico específico individual. El término "anticuerpo monoclonal" abarca no solamente anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadena individual (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden porción de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida y la capacidad de unirse a un antígeno. No se pretende que se limite con relación a la fuente del anticuerpo o la manera en la que se prepara (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fago, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.).

Como se usa en el presente documento, el término "factor de crecimiento neuronal" y "NGF" se refiere al factor de crecimiento neuronal y sus variantes que retienen al menos parte de la actividad de NGF. Como se usa en el presente documento, NGF incluye todas las especies de mamífero de NGF de secuencia nativa, incluyendo ser humano, canino, felino, equino, o bovino.

"Receptor de NGF " se refiere a un polipéptido que está unido por o activado por NGF. Los receptores de NGF incluyen el receptor de TrkA y el receptor p75 de cualquier especie de mamífero, incluyendo, pero sin limitación a,

humano, canino, felino, equino, primate o bovino.

Un "antagonista de NGF " se refiere a cualquier molécula que bloquea, suprime o reduce (incluyendo de manera significativa) la actividad biológica de NGF, incluyendo rutas hacia abajo mediadas por la señalización de NGF, tales como unión y / o provocación de receptor de una respuesta celular a NGF. El término "antagonista" no implica mecanismo específico de acción biológica en absoluto, y se considera que expresamente incluye y abarca todas las interacciones posibles farmacológicas, fisiológicas, y bioquímicas con NGF bien directas o indirectas, o bien que interactúa con NGF, su receptor, o a través de otro mecanismo, y sus consecuencias que se pueden lograr mediante una diversidad de composiciones diferentes, y químicamente divergentes. Los antagonistas de NGF ejemplares incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-NGF, una molécula de sentido opuesto dirigida a un NGF (incluyendo una molécula de sentido opuesto dirigida a un ácido nucleico que codifica NGF), un compuesto inhibidor de NGF, un análogo estructural de NGF, una mutación negativa dominante de un receptor TrkA que se une a un NGF, una inmunoadhesina de TrkA, un anticuerpo anti-TrkA, un anticuerpo anti-p75, y un inhibidor de la quinasa. Para el propósito de la presente invención, se entenderá explícitamente que el término "antagonista" abarca todos los términos identificados previamente, títulos, y estados funcionales y características por lo cual el propio NGF, una actividad biológica de NGF (incluyendo pero no limitada a la capacidad para mediar cualquier aspecto de dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso), o las consecuencias de la actividad biológica, están sustancialmente anuladas, disminuidas, o neutralizadas en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un antagonista de NGF (por ejemplo, un anticuerpo) se une (interactúa físicamente con) NGF, se une a un receptor de Receptor de NGF (tales como receptor TrkA y / o receptor p75), reduce (impide y / o bloquea) cadena abajo la señalización de receptor de NGF hacia abajo, y / o inhibe (reduce) la síntesis de NGF, producción o liberación. En otras realizaciones, un antagonista de NGF se une a NGF y evita la dimerización del receptor TrkA y / o autofosforilación de TrkA. En otras realizaciones, un Antagonista de NGF inhibe o reduce la síntesis y / o producción (liberación) de NGF. Los ejemplos de los tipos de antagonista de NGFs se proporcionan en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo anti-NGF" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a NGF e inhibir la actividad biológica de NGF y / o la (s) ruta (s) hacia abajo mediadas por la señalización de NGF.

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

"Actividad biológica" de NGF en general se refiere a la capacidad de unirse a los receptores de NGF y / o activar las rutas de señalización del receptor de NGF. Sin limitación, una actividad biológica incluye una cualquiera o más de lo siguiente: la capacidad de unirse a un receptor de NGF (tal como p75 y / o TrkA); la capacidad de promover la dimerización y / o autofosforilación del Receptor TrkA y / o; la capacidad de activar una ruta de señalización del receptor de NGF; la capacidad para promover la diferenciación, proliferación, supervivencia, crecimiento, migración celular y otros cambios en la fisiología celular, incluyendo (en el caso de las neuronas, incluyendo neurona periférica y central) cambio en la morfología neuronal, sinaptogénesis, función sináptica, neurotransmisor y / o liberación neuropeptídica y regeneración después del daño; y la capacidad de mediar dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" es un planteamiento para la obtención de resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para el propósito de esta invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de lo siguiente: mejora en cualquier aspecto del dolor incluyendo disminución de la gravedad, alivio de uno o más síntomas asociados a dolor de cáncer de hueso (por ejemplo, dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso) incluyendo cualquier aspecto de dolor de cáncer de hueso (tal como acortamiento de la duración de dolor, y / o reducción de la sensibilidad o sensación de dolor).

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para efectuar resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyendo alivio o reducción del dolor. Para el propósito de esta invención, una cantidad eficaz de un antagonista de NGF es una cantidad suficiente para tratar, mejorar, reducir la intensidad de o evitar el dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso. En algunas realizaciones, la "cantidad eficaz" puede reducir el dolor del dolor continuado y / o cambio radical del dolor (incluyendo dolor ambulatorio and dolor provocado por tocamiento), y se puede administrar antes, durante, y / o después que el cáncer tenga metástasis al hueso. En alguna realización, la "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso.

"Reducción de la incidencia" de dolor significa cualquier reducción de la gravedad (que puede incluir la reducción de la necesidad y / o cantidad de (por ejemplo, exposición a) otros fármacos y / o terapias en general usadas para estas afecciones), duración, y / o frecuencia (incluyendo, por ejemplo, retraso o incremento del tiempo para el dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado metástasis de hueso en un individuo). Como entienden los expertos en la técnica, los individuos pueden variar en términos de su respuesta al tratamiento, y, como tal, por ejemplo, un "procedimiento de reducción de la incidencia de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso en un individuo" refleja la administración del antagonista de NGF descrito en el presente documento basándose en una expectativa razonable de que tal administración puede probablemente provocar tal reducción en la incidencia en el individuo particular.

"Mejora" de dolor de cáncer de hueso (tal como dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso) uno o más síntomas de dolor de cáncer de hueso significa una disminución de o mejora de uno o más síntomas de un dolor de cáncer de hueso cuando se compara con la no administración de un antagonista de NGF. "Mejora" también incluye el acortamiento o reducción en la duración de un síntoma.

- 5 "Paliación" de dolor de cáncer de hueso (tal como dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso) o uno o más síntomas de un dolor de cáncer de hueso significa la disminución del grado de una o más manifestaciones clínicas no deseables de dolor de cáncer de hueso en un individuo o población de individuos tratados con un anticuerpo de NGF de acuerdo con la invención.

10 Como se usa en el presente documento, "retraso del" desarrollo del dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso significa que difiere, impide, ralentiza, retrasa, estabiliza, y / o pospone la progresión de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso. Este retraso puede ser de longitudes de tiempo variables, dependiendo de la historia de la enfermedad y / o individuos que se están tratando. Como es evidente para los expertos en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, de hecho, abarcar la prevención, es las dosis individuales que no desarrollan dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso. Un procedimiento que "retrasa" el desarrollo del síntoma es un procedimiento que reduce la probabilidad de desarrollar el síntoma en un intervalo de tiempo dado y / o reduce el grado de los síntomas en un intervalo estructural de tiempo dado, cuando se compara con el no uso del procedimiento. Tales comparaciones se basan típicamente en estudios, que usan numerosos sujetos suficientes para proporcionar un resultado estadísticamente significativo.

20 "Desarrollo" o "progresión" de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso significa manifestaciones iniciales y / o progresión resultante del trastorno. Desarrollo de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso se puede determinar y valorar usando técnicas clínicas convencionales bien conocidas en la técnica. Sin embargo, desarrollo también se refiere a la progresión que puede ser indetectable. Para el propósito de esta invención, desarrollo o progresión se refiere al curso biológico de los síntomas. "Desarrollo" incluye aparición, recurrencia, y comienzo. Como se usa en el presente documento
25 "comienzo" o "aparición" de dolor de cáncer de hueso (tal como dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso) incluye el comienzo inicial y / o recurrencia.

30 Como se usa en el presente documento, "co-administración" incluye la administración simultánea y / o administración en tiempos diferentes. Co-administración también abarca la administración en forma de una co-formulación (es decir, el antagonista de NGF y un agente están presentes en la misma composición) o administración en forma de composiciones separadas. Como se usa en el presente documento, co-administración significa que abarca cualquier circunstancia en la que un agente y antagonista de NGF se administran a un individuo, que se puede producir de manera simultánea y / o separada. Como se describe además en el presente documento, se entiende que el antagonista de NGF y un agente se puede administrar a diferentes frecuencias o intervalos de dosificación. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF se puede administrar semanalmente, mientras que el agente se puede administrar más frecuentemente. Se entiende que el antagonista de NGF y el agente se puede administrar usando la misma vía de administración o diferentes vías de administración.

40 El término "analgésico opioide" se refiere a todos los fármacos, naturales o sintéticos, con acciones de tipo morfina. Los analgésicos opioides sintéticos y semisintéticos son derivados de cinco clases químicas de compuesto: fenantrenos; fenilheptilaminas; fenilpiperidinas; morfina; y benzomorfinas, todos los cuales están dentro del ámbito del término. Los analgésicos opioides ejemplares incluyen codeína, dihidrocodeína, diacetilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, levorfanol, oximorfona, alfentanil, buprenorfina, butorfanol, fentanil, sufentanil, meperidina, metadona, nalbufina, propoxifeno y pentazocina o sus sales farmacéuticamente aceptables.

45 El término "AINE" se refiere a un compuesto no esteroide antiinflamatorio. Los AINE se clasifican en virtud de su capacidad de inhibir la ciclooxigenasa. Ciclooxigenasa 1 y ciclooxigenasa 2 son dos de las principales isoformas de la ciclooxigenasa y la mayoría de los AINE convencionales son inhibidores mixtos de dos isoformas. La mayoría de los AINE convencionales están dentro de una de las siguientes categorías estructurales: (1) derivados de ácido propiónico, tales como ibuprofeno, naproxeno, naprosin, diclofenac, y ketoprofeno; (2) derivados de ácido acético, tales como tolmetin y slindac; (3) derivados de ácido fenámico, tales como ácido mefenámico y ácido meclofenámico; (4) derivados de ácido bifenilcarboxílico, tales como diflunisal y flufenisal; y (5) oxicams, tales como piroxim, sudoxicam, e isoxicam.

50 Se ha descrito otra clase de AINE que de manera selectiva inhibe la ciclooxigenasa 2. Se han descrito inhibidores de Cox-2, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos números. 5.616.601; 5.604.260; 5.593.994; 5.550.142; 5.536.752; 5.521.213; 5.475.995; 5.639.780; 5.604.253; 5.552.422; 5.510.368; 5.436.265; 5.409.944; y 5.130.311. Ciertos inhibidores de la COX-2 ejemplares incluyen celecoxib (SC-58635), DUP-697, flosulida (CGP-28238), meloxicam, ácido 6-metoxi-2- nafilacético (6-MNA), rofecoxib, MK-966, nabumetona (profármaco para 6-MNA), nimesulida, NS-398, SC-5766, SC-58215, T-614; o sus combinaciones.

Un "individuo" es un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales de granja, animales de deporte, mascotas, primates, caballos, perros, gatos, ratones y ratas.

Usos médicos de la Invención

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

Usos médicos para prevenir o tratar dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso

La presente invención es útil para tratar, retrasar el desarrollo de y / o prevenir dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso en un individuo, tanto en seres humanos como no humanos. La calidad de vida en individuos que tienen cáncer de hueso se puede mejorar.

Metástasis de cáncer al hueso puede estar asociada a una formación de hueso neta o una destrucción de hueso neta. La presente invención es útil para tratar dolor de cáncer de hueso a partir de cáncer a metástasis de hueso con actividad osteoblástica. En algunas realizaciones, el uso médico de la invención se usa para el tratamiento de dolor de cáncer de hueso asociado a una formación de hueso neta (actividad osteoblástica), tal como para tratar dolor de metástasis de cáncer de próstata al hueso. En algunas realizaciones, el uso médico de la invención se usa para el tratamiento de dolor de cáncer de hueso asociado a una destrucción de hueso neta (actividad osteolítica).

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, el uso médico de la invención comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un AINE. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide y un AINE. En algunas realizaciones, la cantidad del analgésico opioide y / o el AINE administrado para el alivio del dolor se reducen, comparado con la cantidad administrada en la ausencia del antagonista de NGF. Los efectos adversos debidos al analgésico opioide y / o el AINE se puede reducir o eliminar cuando se co-administran con el antagonista de NGF. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un analgésico opioide. En otras realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un AINE. En otras realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un analgésico opioide y / o un AINE.

En otro aspecto, los usos médicos de la invención previenen, mejoran y / o previenen el desarrollo o progresión de dolor de cáncer de hueso. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un AINE. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide y un AINE. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un analgésico opioide. En otras realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un AINE. En otras realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un analgésico opioide y / o un AINE.

Se aprecia que aunque se hace en general referencia en el presente documento para el tratamiento o prevención de dolor de cáncer de hueso desde cáncer a metástasis de hueso con actividad osteoblástica, el antagonista de NGF se puede administrar antes de un suceso o afección (es) con un riesgo aumentado de dolor de cáncer de hueso.

Un antagonista de NGF se puede administrar junto con otras terapias para cáncer de hueso, tales como radiación, y quimioterapia. El antagonista de NGF también se puede administrar junto con otros analgésicos usados para el dolor de cáncer de hueso. Los ejemplos de tales analgésicos son bisfosfonatos (por ejemplo, Alendronate), gabapentina, y radiación. La cantidad de estos analgésicos administradas para el alivio del dolor de cáncer de hueso se puede reducir, comparando con la cantidad administrada en la ausencia del antagonista de NGF. Los efectos adversos debidos a estos analgésicos se pueden reducir o eliminar cuando se co-administran con el antagonista de NGF.

La diagnosis o valoración de dolor está bien establecido en la técnica. La valoración se puede realizar basándose en una medición objetiva, tal como observación del comportamiento tal como reacción a los estímulos, expresiones faciales y similares. La valoración también se puede basar en mediciones subjetivas, tal como caracterización del dolor del paciente usando diversas escalas de dolor. Véase, por ejemplo, Katz y col, Surg Clin North Am. (1999) 79 (2): 231 - 52; Caraceni y col. J Pain Symptom Manage (2002) 23 (3): 239 - 55.

Antagonistas de NGF

La invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-NGF. Se desvelan otros antagonistas de NGF en el presente documento. Un antagonista de NGF se refiere a cualquier molécula que bloquea, suprime o reduce (incluyendo de manera significativa) la actividad biológica de NGF, incluyendo las rutas hacia abajo mediadas por la señalización de NGF, tal como unión al receptor y / o provocación de una respuesta celular a NGF. El término "antagonista" no implica mecanismo específico de acción biológica en absoluto, y se considera que expresamente incluye y abarca todas las interacciones posibles farmacológicas, fisiológicas, y bioquímicas con NGF y sus consecuencias que se pueden lograr mediante una diversidad de composiciones diferentes y químicamente divergentes. Los antagonistas de NGF incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo anti-NGF, una molécula antisentido dirigida a un NGF

(incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica NGF), una molécula antisentido dirigida hacia un receptor de NGF (tal como trkA y/o p75) (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica un receptor de NGF), un compuesto inhibitorio de NGF, un análogo estructural de NGF, una mutación negativa dominante de un receptor TrkA que se une a un NGF, una inmunoadhesina de TrkA, un anticuerpo anti-TrkA, una mutación negativa dominante de un receptor p75 que se une a un NGF, un anticuerpo anti-p75 y un inhibidor de quinasa. Para el propósito de la presente invención, se entenderá explícitamente que el término "antagonista" abarca todos los términos identificados previamente, títulos, y estados funcionales y características por lo cual el propio NGF, una actividad biológica de NGF (incluyendo pero no limitada a la capacidad para mediar cualquier aspecto de dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso), o las consecuencias de la actividad biológica, están sustancialmente anuladas, disminuidas, o neutralizadas en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti NGF se une (interactúa físicamente con) el NGF, se une a un receptor NGF (tal como un receptor TrkA y/o receptor p75) y/o reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor NGF aguas abajo. En consecuencia, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-NGF se une (interactúa físicamente con) NGF. Como se desvela en el presente documento como un antagonista de NGF es un polipéptido que se une a NGF. También se desvela en el presente documento como un antagonista de NGF un péptido o un péptido modificado (tal como un péptido de unión a NGF fusionado a un dominio Fc) descrito en el documento PCT WO 2004/026329. También se desvela en el presente documento como un antagonista de NGF un antagonista de NGF que se une a un receptor NGF (tal como el receptor trkA o p75). También se desvela en el presente documento un antagonista de NGF que es un antagonista de NGF que reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor de NGF corriente abajo (por ejemplo, inhibidores de la señalización de quinasa e inhibidores de la cascada de señalización corriente abajo). En otras realizaciones, un antagonista de NGF inhibe (reduce) la síntesis y/o liberación de NGF. También se desvela en el presente documento un antagonista de NGF que no es una inmunoadhesina de TrkA (es decir, es distinta de una inmunoadhesina de TrkA). También se desvela en el presente documento un antagonista de NGF que es un antagonista de NGF distinto de una inmunoadhesina de TrkA y distinto de un anticuerpo anti-NGF. En alguna realización, el antagonista de NGF se une a NGF (tal como hNGF) y no se une significativamente a las neurotrofinas relacionadas, tales como NT-3, NT4/5 y/o BDNF. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no se asocia a una respuesta inmune adversa. En todavía otras realizaciones, el anticuerpo anti NGF está humanizado (tal como anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es anticuerpo E3 (como se describe en el presente documento). En otras realizaciones el anticuerpo anti-NGF comprende una o más CDR (s) de anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o; en algunas realizaciones, las CDR de E3). En otras realizaciones, el anticuerpo es humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anti-NGF humano que neutraliza el anticuerpo descrito en el documento WO 2005/019266. En todavía otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada mostrada en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera mostrada en la Tabla 2 (SEQ ID NO:2). En todavía otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no desencadena la lisis mediada por complemento, o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en el documento Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613 - 2624; Solicitud PCT N° PCT/GB99/01441; y / o la Solicitud de Patente de Reino Unido N° 9809951.8.

Anticuerpos Anti-NGF

La presente invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión de NGF humano a trkA y/o p75. Un anticuerpo anti-NGF debe mostrar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unirse a NGF e inhibir la actividad biológica de NGF y / o rutas hacia abajo mediadas por la función de señalización de NGF; (b) prevenir, mejorar, o tratar cualquier aspecto de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso; (c) bloquear o disminuir la activación del receptor de NGF (incluyendo receptor TrkA dimerización y / o autofosforilación); (d) incrementar la eliminación de NGF; (e) inhibir (reducir) la síntesis, producción o liberación de NGF.

Los anticuerpos Anti-NGF se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, Publicación PCT Números. WO 01/78698, WO 01/64247, patentes de Estados Unidos. 5.844.092. 5.877.016. y 6.153.189; Hongo y col., Hybridoma, 19: 215 - 227 (2000); Cell. Molec. Biol. 13: 559 - 568 (1993); Números de acceso de GenBank, U39608, U39609, L17078, o L17077.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es un anticuerpo monoclonal anti-NGF humanizado de ratón denominado anticuerpo "E3" (PCT WO 04/058184), que comprende la región constante de IgG2a de la cadena pesada humana que contiene las siguientes mutaciones: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2a de tipo salvaje; véase Eur. J. Immunol. (1999) 29:2613-2624); la región constante kappa humana de cadena ligera; y las regiones variables de cadena pesada y ligera mostradas en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1: Región variable de la cadena pesada

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIHWG
 DGTDDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDY
 WGQGTLVTVS (SEQ ID NO:1).

Tabla 2: Región variable de la cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR
 FHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRT (SEQ
 ID NO:2).

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

Material		Nº de acceso de ATCC	Fecha de Depósito
Vector Eb.911.3E	región de cadena ligera V de E3	PTA-4893	8 de enero de 2003
Vector Eb.pur.911.3E	región cadena ligera V de E3	PTA-4894	8 de enero de 2003
Vector Db.911.3E	región cadena pesada V de E3	PTA-4895	8 de enero de 2003

- 10 Vector Eb.911.3E es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena ligera mostrada en la Tabla 2; vector Eb.pur. 911.3E es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena ligera mostrada en la Tabla 2 y vector Db.911.3E es un polinucleótido que codifica la región variable de la cadena pesada mostrada en la Tabla 1. Estos polinucleótidos también codifican los dominios constantes.

- 15 Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un planteamiento basado en la variabilidad de la secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat y col. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) un planteamiento basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia y col. (1989) Nature 342: 877; Al-lazikani y col (1997) J. Molec. Biol. 273: 927 - 948)). Como se usa en el presente documento, una CDR se refiere a las CDR definidas mediante cualquier planteamiento o mediante una combinación de ambos planteamientos.

- 20 En otra realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una o más CDR (s) del anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o, en algunas realizaciones, las seis CDR de E3). La determinación de las regiones de CDR está también dentro de la experiencia en la técnica. La (las) CDR (s) puede (n) ser Kabat, Chothia, o una combinación de Kabat y Chothia.

- 25 Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden abarcar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos bispecíficos, anticuerpos heteroconjugados, de una sola cadena (ScFv), mutantes de los mismos; proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo, anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos, y anticuerpos modificados de manera covalente. Los anticuerpos pueden ser de tipo murino, rata, humano, o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados). Para el propósito de esta invención, el anticuerpo reacciona con NGF de una manera que inhibe NGF y / o las rutas hacia abajo mediadas por la función de señalización de NGF. En una realización, es anticuerpo es un anticuerpo humano que reconoce uno o más epítopos sobre NGF humano. En otra realización, el anticuerpo en un anticuerpo de ratón o rata que reconoce uno o más epítopos sobre NGF humano. En otra realización, el anticuerpo reconoce uno o más epítopos sobre un NGF seleccionado entre el grupo constituido por primate, canino, felino, equino, y bovino. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no desencadena la lisis mediada por complemento, o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC). La actividad de ADCC puede ser calculada usando los procedimientos publicados en la patente U.S. Nº 5, 500, 362. En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613 - 2624; Solicitud PCT Nº PCT/GB99/01441; y / o la Solicitud de Patente de Reino Unido Nº 9809951.8.
- 30
- 35
- 40

La afinidad de unión de un anticuerpo anti-NG F a NGF (tal como hNGF) puede ser aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,80 nM, aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,75 nM y aproximadamente 0,18 a

aproximadamente 0,72 nM. En una realización, la afinidad de unión está entre aproximadamente 2 pM y 22 pM. En alguna realización, la afinidad de unión es aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es menos de aproximadamente 10 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es aproximadamente 0,1 nM o aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es menos de aproximadamente 0,1 nM, o menos de aproximadamente 0,07 nM. En otras realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM a cualquiera de aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, o aproximadamente 40 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM, o menos de aproximadamente 50 pM. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es menos de cualquiera de aproximadamente 100 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, o aproximadamente 50 pM. En todavía otras realizaciones, la afinidad de unión es aproximadamente 2 pM, aproximadamente 5 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 15 pM, aproximadamente 20 pM, aproximadamente 40 pM, o mayor de aproximadamente 40 pM.

Una forma de determinar la afinidad de unión de anticuerpos a NGF es mediante la medida de afinidad de unión de fragmentos monofuncionales Fab del anticuerpo. Para obtener los fragmentos monofuncionales Fab, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) se puede escindir con papaína o expresarse de manera recombinante. La afinidad de un fragmento de anti-NGF Fab de un anticuerpo se puede determinar mediante resonancia de plasmón de superficie (sistema de resonancia de plasmón de superficie (SPR)B1 Acore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ). Los procesadores CM5 se pueden activar con N-etil-N'-(3- dimetilaminopropil)-carbodiinida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. NGF humano (o cualquier otro NGF) se puede diluir en 10 mM de acetato de sodio pH 4,0 e inyectarse sobre el procesador activado a una concentración de 0,005 mg/ml. Usando tiempo de flujo variable a través de los canales del procesador individuales, se pueden lograr dos intervalos de densidad de antígeno: unidades de respuesta 100 - 200 (RU) para los estudios cinéticos detallados y 500-600 RU para los ensayos de selección. El procesador se puede bloquear con etanolamina. Estudios de regeneración han mostrado que una mezcla de tampón de elución de Pierce (Producto N° 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) y 4 M de NaCl (2:1) elimina de manera eficaz el Fab unido mientras se mantiene la actividad de hNGF sobre el procesador durante 200 inyecciones. Tampón HBS-EP (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% de tensioactivo P20) se usa como tampón de desarrollo para los ensayos BIAcore. Se inyectan diluciones en serie (0,1 - 10 x de K_D estimada) de muestras de Fab purificadas durante 1 min a 100 μ L/min y se permitieron tiempos de disociación de hasta 2 h. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan mediante ELISA y / o electroforesis SDS-PAGE usando un Fab de concentración conocida (como se determina por el análisis de amino) como un estándar. Las tasas de asociación cinética (k_{on}) y de disociación (k_{off}) se obtienen de manera simultánea mediante ajuste de los datos hasta 1: 1 modelo de unión de Langmuir (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6. 99 - 110) usando el programa de BIAevaluación. Los valores de constante de disociación de equilibrio (K_D) se calculan como k_{off}/k_{on} . Este protocolo es adecuado para el uso en la determinación de afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier NGF, incluyendo NGF humano, NGF de otro vertebrado (en algunas realizaciones, mamífero) (tal como NGF de rata, NGF de rata, NGF de primate), así como para el uso con otras neurotropina, tales como las neurotropina relacionadas NT3, NT4/5, y / o BDNF.

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

El (los) epítipo (s) pueden ser continuo (s) o discontinuo (s). En una realización, el anticuerpo se une esencialmente a los mismos epítopos de hNGF como un anticuerpo seleccionado entre el grupo constituido por MAb 911, MAb 912, y MAb 938 como se describe en Hongo y col., *Hybridoma*, 19: 215 - 227 (2000). En otra realización, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo de hNGF que MAb 911. En todavía otra realización, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo que MAb 909. Hongo y col., *supra*. Por ejemplo, el epítipo puede comprender uno o más de: restos K32, K34 y E35 dentro de la región variable 1 (aminoácidos 23 - 35) de hNGF; restos F79 y T81 dentro de la región variable 4 (aminoácidos 81 - 88) de hNGF; restos H84 y K88 dentro de la región variable 4; resto R103 entre la región variable 5 (aminoácidos 94 - 98) de hNGF y el extremo C (aminoácidos 111 - 118) de hNG F; resto E11 dentro de la pre-región variable 1 (aminoácidos 10 - 23) de hNG F; Y52 entre la región variable 2 (aminoácidos 40 - 49) de hNGF y la región variable 3 (aminoácidos 59 - 66) de hNGF; restos L112 y S113 dentro del extremo de hNGF; restos R59 y R69 dentro de la región variable 3 de hNGF; o restos V18, V20, y G23 dentro de la pre-región variable 1 de hNGF. además, un epítipo puede comprender una o más de la región variable 1, región variable 3, región variable 4, región variable 5, la región del extremo N, y/ o el extremo C de hNGF. En todavía otra realización, el anticuerpo de manera significativa reduce la accesibilidad del disolvente del resto R103 de hNGF. Se

entiende que aunque los epítomos descritos anteriormente se describen a NGF humano, los expertos en la técnica pueden alinear las estructuras de NGF humano con el NGF de otra especie e identificar las parejas similares a estos epítomos.

5 En un aspecto, los anticuerpos (por ejemplo, humano, humanizado, de ratón, quimérico) que pueden inhibir NGF se pueden preparar mediante el uso de inmunógenos que expresan la secuencia de longitud completa o parcial de NGF. En otro aspecto, un inmunógeno que comprende una célula que sobre expresa NGF se puede usar. Otro ejemplo de un inmunógeno que se puede usar es la proteína de NGF que contiene NGF de longitud completa o una parte de la proteína de NGF.

10 Los anticuerpos anti-NGF se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. La vía y programa de inmunización del animal huésped están en general en custodia con técnicas establecidas y convencionales para la estimulación y producción del anticuerpo, como se describe adicionalmente en el presente documento. Las técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón se conocen en la técnica y están descritos en el presente documento.

15 Se contempla que cualquier sujeto mamífero incluyendo seres humanos o anticuerpo que produce células de los mismos se puede manipular para que sirva como la base de producción de líneas celulares de mamífero, incluyendo ser humano, hibridoma. Típicamente, el animal huésped se inocula por vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar, y / o intradérmica con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como se describe en el presente documento.

20 Los Hibridomas se pueden preparar a partir de linfocitos y células inmortalizadas de mieloma usando la técnica de hibridación de células somática general de Kohler, B. y Milstein, C. (1975) Nature 256: 495 - 497 o como se ha modificado por Buck, D. W., y col., In Vitro, 18: 377-381 (1982). Líneas celulares de mieloma, que incluyen pero no se limitan a X63-Ag8.653 y las de Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., Estados Unidos, se pueden usar en la hibridación. En general, la técnica implica la fusión de células de mieloma y células linfoides que usan un fusógeno tal como polietilen glicol, o mediante medios eléctricos bien conocidos por los expertos en la técnica. Después de la fusión, las células se separan del medio de y se desarrollan en un medio de crecimiento selectivo, tal como medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), para eliminar las células precursoras no hibridadas. Cualquiera de los descritos en el presente documento, suplementados con o sin suero, se pueden usar para cultivar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa de la técnica de fusión de células, células B inmortalizadas por EBV se pueden usar para producir los anticuerpos monoclonales anti-NGF de la invención sujeto. Los hibridomas se expanden y se subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se ensayan para actividad anti-inmunógeno mediante procedimientos de inmunoensayos convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo de enzima, o inmunoensayo de fluorescencia).

30 Los hibridomas que se pueden usar como fuente de anticuerpos abarca todos los derivados de, células de progenie de los hibridomas precursores que producen anticuerpos monoclonales específicos para NGF, o una porción de los mismos.

35 Los hibridomas que producen tales anticuerpos se pueden desarrollar *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar del medio de cultivo o de fluidos corporales, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como precipitación por sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía, y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada si está presente, se puede eliminar, por ejemplo, desarrollando la preparación sobre adsorbentes hechas de inmunógeno unidas a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal huésped con un NGF humano, o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugada a una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar, por ejemplo, hemocionina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, o inhibidor de la tripsina de soja usando un agente bifuncional o de derivarización, por ejemplo maleimidobenzol sulfosuccinimida éster (conjugación mediante restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante restos de lisina), glutaradehído, anhídrido succínico, SOC12, o R1 N=C=NR, donde R y R1 son grupos alquilo diferentes, pueden producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

40 Si se desea, el anticuerpo anti-NGF (monoclonal o policlonal) de interés se pueden secuenciar y la secuencia de polinucleótidos se puede después clonar en un vector para expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede mantener en vector en una célula huésped and la célula huésped se puede después expandir y congelar para el uso futuro. En una alternativa, la secuencia de polinucleótidos se puede usar para la manipulación genética para "humanizar" el anticuerpo o para mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante se puede modificar por ingeniería genética para que se parezca a más regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmune si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en seres humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia de anticuerpos para obtener mayor afinidad a NGF y mayor eficacia en la inhibición de NGF. Será evidente para los expertos en la técnica que uno o más cambios de polinucleótido se pueden hacer al anticuerpo anti-NGF y todavía mantener su capacidad de unión a NGF.

Anticuerpos "humanizados" se refieren en general a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno se está sustancialmente derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana y la estructura de inmunoglobulina remanente de la molécula basada en la estructura y / o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender cualesquiera dominios variables completas fusionadas sobre dominios constantes o solamente las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco conservadas en los dominios variables. Sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo salvaje o modificadas por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados para que se parezcan más estrechamente a inmunoglobulina humana. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original. En algunos casos, restos de la región marco conservada (FR) u otros restos de la inmunoglobulina humana reemplazada por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo del receptor o en el anticuerpo del donante.

Existen cuatro etapas para humanizar un anticuerpo monoclonal. Éstas son: (1) determinar la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos predicha de los dominios variables ligeros y pesados del anticuerpo de partida (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región marco conservada de anticuerpo usar durante el procedimiento de humanización (3) las metodologías /técnicas de humanización reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Números 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; 6.180.370; y 6.548.640.

Se han descrito un número de moléculas de anticuerpo "humanizado" que comprende un sitio de unión a antígeno de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o de roedor modificadas y sus regiones determinantes de complementariedad asociadas (CDR) condensadas a dominios constantes humanos. Véase, por ejemplo, Winter y col. Nature 349: 293 - 299 (1991), Lobuglio y col. Proc. Nat. Acad. Sci Estados Unidos 86: 4220 - 4224 (1989), Shaw y col. J Immunol. 138: 4534 - 4538 (1987), y Brown y col. Cancer Res. 47: 3577 - 3583 (1987). Otras referencias describen CDR de roedores injertadas en una región marco conservada (FR) que soporta un ser humano antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo apropiado humano. Véase, por ejemplo, Riechmann y col. Nature 332: 323 - 327 (1988), Verhoeven y col. Science 239: 1534 - 1536 (1988), y Jones y col. Nature 321 : 522 - 525 (1986). Otra referencia describe las CDR de roedor soportadas por regiones marco conservadas de roedor de manera recombinante chapada. Véase, por ejemplo, Publicación de Patente Europea N° 0519596. Estas moléculas "humanizadas" se diseñan para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo anti-humano de roedor que limita la duración y eficacia de aplicaciones terapéuticas de esos restos en receptores humanos. Por ejemplo, la región constante de anticuerpo se puede modificar por ingeniería genética de manera que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, no desencadena lisis por complemento). Véase, *por ejemplo*, Solicitud PCT N° PCT/GB99/01441; Solicitud de patente de Reino Unido N° 9809951.8. Otros procedimientos de humanización de anticuerpos que también se pueden utilizar se describen por Daugherty y col., Nucl. Acids Res. 19: 2471 - 2476 (1991) y en las patentes de Estados Unidos números 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; and 6.350.861; y en la Publicación PCT N° WO 01/27160. La humanización también puede incluir maduración por afinidad. Véase, por ejemplo, documento U.S. N° de serie 10/745,775, y PCT/US03/41252.

En todavía otra alternativa, los anticuerpos completamente humanos se pueden obtener mediante el uso de ratones comercialmente disponibles que se han modificado por ingeniería genética para expresar proteínas de inmunoglobulina humana específicas. Los animales transgénicos que se diseñan para producir una más deseable (por ejemplo, anticuerpos totalmente humanos) o respuesta inmune más robusta también se pueden usar para la generación de anticuerpos humanos. Los ejemplos de tal tecnología son Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

En una alternativa, los anticuerpos se pueden preparar de manera recombinante y expresarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En otra alternativa, los anticuerpos se pueden preparar de manera recombinante mediante tecnología de despliegue en fago. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Números 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150; y Wintery col., Annu. Rev. Immunol. 12: 433 - 455 (1994). Como alternativa, la tecnología de despliegue en fago (McCafferty y col., Nature 348: 552 - 553 (1990)) se puede usar para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpo humanos *in vitro*, de repertorios génicos de dominio variable de inmunoglobulina (V) de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio de anticuerpo V se clonan en fase en o bien una proteína principal o secundaria de un bacteriófago filamentosa, tal como M13 o fd, y se despliega como fragmentos de anticuerpo funcional sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la particular filamentosa contiene una copia de ADN de una sola cadena del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra estas propiedades. De este modo, el fago imita a alguna de las propiedades de la célula B. Despliegue en fago se puede demostrar en una diversidad de formatos; para revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564 - 571 (1993). Varias Fuentes de los segmentos del gen V se pueden usar para despliegue en fago. Clackson y col., Nature 352: 624 - 628 (1991) aislado de una disposición diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña genoteca de combinación al azar de genes V derivada de los bazo de ratones inmunizados. Un repertorio de genes V de

- donantes humanos no inmunizados se puede construir y se pueden aislar anticuerpos para una disposición diversa de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Mark y col., J Mol. Biol. 222: 581 - 597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12: 725 -734 (1993). En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpo acumulan mutaciones a una alta velocidad (hipermutación somática). Alguno de los cambios introducidos conferirán una alta afinidad, y las células B que muestran inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican de manera preferente y se diferencian durante la exposición al antígeno posterior. Este procedimiento natural se puede imitar mediante la técnica conocida por "recomposición de cadena." Marks, y col., BiolTechnol. 10: 779 - 783 (1992)). En este procedimiento, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenidos mediante despliegue en fago se puede mejorar mediante reemplazo de manera secuencial de los genes de la región V de cadena pesada y ligera con repertorios de variantes de origen natural (repertorios) de los genes del dominio V obtenidos a partir de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo pM-nM. Una estrategia para preparar repertorios de anticuerpo de fago muy grandes (también conocidos como "la madre de todas las genotecas") se ha descrito por Waterhouse y col., Nucl. Acids Res. 21 : 2265 - 2266 (1993). La recomposición de genes también se puede usar para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se llama "marca de epítipo"; el gen del dominio V de cadena pesada o ligera V de anticuerpos de roedor obtenido mediante la técnica de despliegue de fago se reemplaza con un repertorio de genes del dominio V humanos, creando quimeras de roedor - humano. La selección sobre el antígeno da como resultado el aislamiento de regiones variables humanas capaces de reestablecer un sitio de unión a antígeno funcional, Es decir, el epítipo gobierna (marca) la elección del participante. Cuando el proceso se repite con el fin de reemplazar el dominio V del roedor remanente, se obtiene un anticuerpo humano (véase la Publicación PCT N° WO 93/06213, publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedor mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de marco conservado o de CDR de origen de roedor.
- Es evidente que aunque la descripción anterior pertenece a anticuerpos humanizados, los principios generales descritos con aplicables a la personalización de anticuerpos para uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. Además es evidente que uno o más aspectos de humanización de un anticuerpo descritos en el presente documento se pueden combinar, por ejemplo, injerto de CDR, mutación de marco conservado y mutación de CDR.
- Los anticuerpos se pueden preparar de manera recombinante primero mediante aislamiento de los anticuerpos y células que producen anticuerpo de animales huésped, que se obtienen de la secuencia de genes, y usando la secuencia de genes para expresar el anticuerpo de manera recombinante en células huésped (por ejemplo, células CHO). Otro procedimiento que se puede emplear es expresar la secuencia de anticuerpo en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Se han descrito los procedimientos para expresar anticuerpos de manera recombinante en plantas o leche. Véanse, por ejemplo, Peeters, y col. Vaccine 19:2756 (2001); Lonberg, N. and D. Huszar Int.Rev.Immunol13:65 (1995); y Pollock, y col., J Immunol Methods 231: 147 (1999). Los procedimientos para preparar derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de una sola cadena, etc. se conocen en la técnica
- También se pueden emplear inmunoensayos y técnicas de clasificación de citometría de flujo tal como clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para aislar los anticuerpos que son específicos para NGF.
- Los anticuerpos se pueden unir a muchos diferentes vehículos. Los vehículos pueden ser activos y / o inertes. Los ejemplos de los vehículos bien conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, vidrio, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser o bien soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los expertos en la técnica conocerán otros vehículos adecuados para unir anticuerpos, o serán capaces de determinar, usando experimentación de rutina.
- ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que sean capaces de unirse de manera específica a genes que codifica las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión (tales como los vectores de expresión descritos en la Publicación PCT N° WO 87/04462), que después se transfectan en células huésped tales como células de E. coli, células de COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO), o células de mieloma que de otra manera no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase, por ejemplo, Publicación PCT N° WO 87/04462. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificadora para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias homólogas de tipo murino, Morrison y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 81 : 6851 (1984), o mediante la unión de manera covalente a toda o parte de la secuencia codificadora de la inmunoglobulina de la secuencia codificadora para un polipéptido de inmunoglobulina. De esa manera, anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" se preparan para que tengan la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-NGF en el presente documento.
- Los anticuerpos Anti-NGF se pueden caracterizar usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento es identificar el epítipo al que se une, o " mapeo de epítipo" Existen muchos procedimientos conocidos en la técnica para el mapeo y caracterización de la localización de epítipos sobre las proteínas,

incluyendo la resolución de la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos de gen, y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el capítulo 11 de Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. En un ejemplo adicional, se puede usar el mapeo de epítipo para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo anti-NGF. El mapeo de epítipo está comercialmente disponible a partir de diversas fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Holanda). El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, contenido en un tramo individual de aminoácidos, o un epítipo conformacional formado por una interacción de tres dimensiones de aminoácidos que no necesariamente pueden estar contenidos en un solo tramo (secuencia lineal de estructura primaria). Péptidos de longitudes variables (por ejemplo, al menos de 4 - 6 aminoácidos de longitud) se pueden aislar o sintetizar (por ejemplo, manera recombinante) y usarse para ensayos de unión con un anticuerpo anti-NGF. En otro ejemplo, el epítipo al que se une el anticuerpo anti-NGF se puede determinar en una selección sistemática mediante el uso de péptidos de superposición derivados de la secuencia de NGF y determinar la unión por el anticuerpo anti-NGF. De acuerdo con los ensayos de expresión de fragmentos de genes, el marco abierto de lectura que codifica NGF se fragmenta o bien al azar o mediante construcciones genéticas específicas y la reactividad de los fragmentos expresados de NGF con el anticuerpo a ensayar se determina. Los fragmentos de genes se pueden, por ejemplo, producir mediante PCR y después transcribirse y traducirse en proteína *in vitro*, en la presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos de NGF marcados radiactivamente se determina después mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel. También se pueden identificar ciertos epítopos mediante el uso de grandes genotecas de secuencias de péptidos al azar desplegadas sobre la superficie de la superficie de las partículas de fago (genotecas de fago). Como alternativa, una genoteca definida de superposición de fragmentos de péptido se puede ensayar para la unión al anticuerpo de ensayo en ensayos de unión simples. En un ejemplo adicional, la mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de selección de alanina se pueden realizar para identificar los restos requeridos, suficientes, y / o necesarios para la unión a epítipo. Por ejemplo, los experimentos de intercambio de dominios se pueden realizar usando un NGF mutante en el que diversos fragmentos del polipéptido de NGF se han reemplazado (intercambio) con secuencias de una proteína distinta estrechamente relacionada pero antigénicamente distinta (tal como otro miembro de la familia de la proteína de neurotropina). Mediante la valoración de la unión del anticuerpo al NGF mutante, la importancia de del fragmento de NGF particular a la unión al anticuerpo se puede determinar.

Todavía otro procedimiento que se puede usar para caracterizar un anticuerpo anti-NGF es usar ensayos de competición con otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno, es decir, diversos fragmentos sobre NGF, para determinar si el anticuerpo anti-NGF se une al mismo epítipo que otros anticuerpos. Los ensayos de competición son bien conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de anticuerpos que se pueden usar en los ensayos de competición para la presente invención incluyen MAb 911, 912, 938, como se describe en Hongo, y col, Hibridoma 19:215-227 (2000).

Otros Antagonistas de NGF

Antagonistas de NGFs distintos de los anticuerpos anti-NGF están desvelados en el presente documento para propósitos comparativos. Como se desvela en el presente documento el antagonista de NGF puede comprender al menos una molécula de sentido opuesto capaz de bloquear o disminuir la expresión de un NGF funcional. Las secuencias de nucleótidos del NGF se conocen y están fácilmente disponibles de las bases de datos disponibles públicamente. Véase, por ejemplo, Borsani y col., Nuc. Acids Res. 1990, 18, 4020; Número de Acceso NM 002506; Ullrich y col., Nature 303: 821 - 825 (1983). Es una rutina preparar moléculas de oligonucleótidos de sentido opuesto que se unirá de manera específica al ARNm de NGF sin reacción cruzada con otros polinucleótidos. Los sitios ejemplares de dirección incluyen, pero no se limitan a, el codón de inicio, las regiones reguladoras en 5', la secuencia codificadora y la región sin traducir en 3'. En alguna divulgación, los oligonucleótidos son de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de longitud, aproximadamente 15 a 50 nucleótidos de longitud, aproximadamente 18 a 25 nucleótidos de longitud, o más. Los oligonucleótidos pueden comprender modificaciones de la estructura central tales como, por ejemplo, enlaces fosforotioato, y modificaciones de azúcar 2'-O bien conocidas en la técnica. Las moléculas de sentido opuesto ejemplares incluyen las moléculas de sentido opuesto de NGF descritas en la Publicación de Estados Unidos N°. 20010046959; véase también <http://www.matec.com/repair.htm>.

En otra divulgación, el antagonista de NGF comprende al menos una molécula de sentido opuesto capaz de bloquear o disminuir la expresión de un receptor funcional de NGF (tales como TrkA y / o p75). Woolf y col., J. Neurosci. (2001) 21 (3): 1047 - 55; Taglialetela y col, J Neurochem (1996) 66 (5): 1826 - 35. Las secuencias de nucleótidos de TrkA y p75 son conocidas y están fácilmente disponibles a partir de las bases de datos públicas.

Como alternativa, la expresión y / o liberación de NGF y / o expresión del receptor de NGF se puede disminuir usando la eliminación del gen, oligonucleótidos de morfolino, RNAi, o ribozimas, procedimientos que son bien conocidos en la técnica Véase <http://www.maclester.edu/~montgomery/RNAL.html>; <http://pub32.ezboard.com/fmorfolinosfrm> 19 .showMessage?topicID=6.topic; <http://www.highveld.com/ribozyme.html>.

En otra divulgación, el antagonista de NGF comprende al menos un compuesto inhibidor de NGF. Como se usa en el presente documento, " compuesto inhibidor de NGF " se refiere a un compuesto distinto de un anticuerpo anti-

NGF que directa o indirectamente reduce, inhibe, neutraliza, o anula la Actividad biológica de NGF. Un compuesto inhibidor de NGF mostrará una cualquiera o más de las siguientes características: (a) se une a NGF e inhibe la actividad biológica de NGF y / o las rutas hacia abajo mediadas por la función de señalización de NGF; (b) evitar, mejorar, o tratar cualquier aspecto de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso; (c) bloquear o disminuir la activación del receptor de NGF (incluyendo dimerización y / o autofosforilación del receptor TrkA); (d) incrementar la eliminación de NGF; (e) inhibir (reducir) la síntesis de NGF, producción o liberación. Los compuestos inhibidores de NGF ejemplares incluyen los inhibidores de NGF de pequeña molécula descritos en la Publicación de estados Unidos N° 20010046959; los compuestos que inhiben la unión de NGF a p75, como se describe en la Publicación PCT N° WO 00/69829, y PD90780 [ácido 7-(benzotilamino)-4,9-dihidro-4-metil-9-oxo-pirazolo[5,1-b]quinazolina-2-carboxílico] como se describe por Colquhoun y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. 310 (2): 505 - 11 (2004); los compuestos que inhiben la unión de NGF a TrkA y / o p75, como se describe en la Publicación PCT N° WO 98/17278. Los ejemplos adicionales de compuestos inhibidores de NGF incluyen los compuestos descritos en las Publicaciones PCT Números WO 02/17914 y WO 02/20479, y en las Patentes de Estados Unidos Números 5.342.942; 6.127.401; and 6.359.130. Los compuestos inhibidores de NGF adicionales ejemplares son compuestos que son inhibidores competitivos de NGF. Véase la Patente de Estados Unidos N° 6.291.247. Además, los expertos en la técnica pueden preparar compuestos inhibidores de NGF de molécula pequeña.

También se desvela en el presente documento como un antagonista de NGF, un compuesto inhibidor de NGF se une a NGF. Los sitios ejemplares de dirección (unión) incluyen, pero no se limitan a, la parte de NGF que se une al receptor TrkA y / o receptor p75, y las partes de NGF que son adyacentes a la región de unión del receptor y que son responsables, en parte, de la forma correcta de tres dimensiones de la parte de unión al receptor. En otra realización, un compuesto inhibidor de NGF se une a un receptor de NGF (tal como TrkA y / o p75) e inhibe una actividad biológica de NGF. Los sitios ejemplares de dirección incluyen las partes de TrkA y / o p75 que se unen a NGF.

En otra divulgación que comprende moléculas pequeñas, una molécula pequeña puede tener un peso molecular de aproximadamente cualquiera de 100 a 20.000 daltons, 500 a 15.000 daltons, o 1000 a 10.000 daltons. Las genotecas de moléculas pequeñas están comercialmente disponibles. Las moléculas pequeñas se pueden administrar usando cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo inhalación, vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intraventricular, oral, entérica, parenteral, intranasal, o dérmica. En general, cuando el antagonista de NGF de acuerdo con la invención es una molécula pequeña, se administrará a la cantidad de 0,1 a 300 mg/kg del peso del paciente dividido en una a tres o más dosis. Para un paciente adulto de peso normal, se pueden administrar dosis que varían entre 1 mg y 5 g por dosis.

En otra divulgación, el antagonista de NGF comprende al menos un análogo estructural de NGF. "Análogos estructurales de NGF " en la presente invención se refiere a compuestos que tienen una estructura de tres dimensiones similar como parte de la de NGF y que se une a un receptor de NGF en condiciones fisiológicas *in vitro* o *in vivo*, en los que la unión al menos parcialmente inhibe una actividad biológica de NGF. En una divulgación, el análogo estructural de NGF se une a un receptor TrkA y / o uno p75. Los análogos estructurales de NGF ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los péptidos bicíclicos descritos en la Publicación PCT N° WO 97/15593; los péptidos bicíclicos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.291.247; los compuestos cíclicos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.017.878; y los péptidos derivados de NGF descritos en la Publicación PCT N° WO 89/09225. Los análogos estructurales de NGF adecuados también se pueden diseñar y sintetizar mediante la modelación molecular de la unión de receptor de NGF, por ejemplo mediante el procedimiento descrito en la Publicación PCT N° WO 98/06048. Los análogos estructurales de NGF pueden ser monómeros o dímeros/oligómeros en cualquier combinación deseada de estructuras iguales o diferentes para obtener afinidades y efectos biológicos mejorados.

La divulgación proporciona un antagonista de NGF que comprende al menos un mutante dominante-negativo del receptor TrkA y / o receptor p75. Los expertos en la técnica pueden preparar mutantes dominantes-negativos de, por ejemplo, el receptor TrkA de manera que el receptor se una al NGF y, de este modo, actuar como un "captador" para capturar los NGF. Los mutantes dominantes-negativos, sin embargo, no tendrán la bioactividad normal del receptor TrkA tras la unión a NGF. Los mutantes dominantes-negativos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los mutantes descritos en las siguientes referencias: Li y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1998, 95, 10884; Eide y col., J. Neurosci. 1996, 16,3123; Liu y col., J. Neurosci 1997, 17,8749; Klein y col., Cell 1990, 61, 647; Valenzuela y col., Neuron 1993, 10,963; Tsoulfas y col., Neuron 1993, 10,975; y Lamballe y col., EMBO J. 1993, 12,3083. Los mutantes dominantes-negativos se pueden administrar en forma de proteína o en la forma de un vector de expresión vector de manera que el mutante dominante-negativo, por ejemplo, receptor Taka mutante, se expresa *in vivo*. La proteína o vector de expresión vector se puede administrar usando cualquier medio conocido en la técnica, tales como por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intraventricular, oral, entérica, parenteral, intranasal, dérmica, o mediante inhalación. Por ejemplo, la administración, de los vectores de expresión incluye administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración oral, pistola de partículas, administración por catéter, y administración tópica. Los expertos en la técnica están familiarizados con la administración de los vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Números 6.436.908; 6.413.942; y 6.376.471.

La distribución dirigida de las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido de sentido opuesto, vector de expresión, o polinucleótidos subgenómicos también se puede usar. Las técnicas de administración de ADN mediada por receptor se describen en, por ejemplo, Findeis y col., Trends Biotechnol. (1993) 11 : 202; Chiou y col., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu y col., J. Biol. Chem. (1988) 263 : 621; Wu y col., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 3655; Wu y col., J. Biol. Chem. (1991) 266:338. Las composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para la administración local en un protocolo de terapia génica. En algunas realizaciones, los intervalos de concentración de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 mg, aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg, and aproximadamente 20 µg a aproximadamente 100 µg de ADN o más también se puede usar durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos de la presente invención se pueden administrar usando vehículos de administración génica. El vehículo de administración génica puede ser de origen viral o no viral (véase en general, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connolly, Human Gene Therapy (1995) 1: 185; y Kapliitt, Nature Genetics (1994) 6: 148). La expresión de tales secuencias codificadoras se pueden inducir usando mamíferos endógenos o promotores y / o potenciadores heterólogos. La expresión de la secuencia codificadora puede ser o bien constitutiva o estar regulada.

Los vectores de base viral para la administración para la administración de un polinucleótido deseado y la expresión en una célula deseada se conocen bien en la técnica. Los vehículos de base viral ejemplares incluyen, pero no se limitan a, retrovirus recombinantes (véase, por ejemplo, Publicaciones PCT Números WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; Patentes de Estados Unidos Números 5.219.740 y 4.777.127; Patente de Gran Bretaña N° 2.200.651; y patente EP N° 0345242), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores de virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), Virus Ross River (ATCC VR373; ATCC VR-1246) y virus de encefalitis equino de Venezuela (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), y vectores de virus asociado a adeno (AAV) (véase, por ejemplo, Publicaciones PCT Números WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 y WO 95/00655). También se puede emplear la administración de ADN ligado a adenovirus como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther (1992) 3:147.

También se pueden emplear los vehículos y procedimientos de administración no viral, incluyendo, pero sin limitación a, ADN policatiónico condensado ligado o no ligado a adenovirus inactivado solo (véase, por ejemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147); ADN ligado a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264: 16985); células vehículo de administración de células eucarióticas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.814.482; Publicaciones PCT Números WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) y neutralización o fusión de carga nucleica con membranas de células. También se puede emplear ADN desnudo. Los procedimientos ejemplares de introducción de ADN desnudo se describen en la Publicación PCT N° WO 90/11092 y la Patente de Estados Unidos N° 5.580.859. Liposomas que pueden actuar como vehículos de administración génica se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.422.120; Publicaciones PCT Números WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y la Patente EP N° 0524968. Planteamientos adicionales se describen en Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14:2411, y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91 :1581.

Es también evidente que un vector de expresión se puede usar para dirigir la expresión de cualquiera de los antagonistas de NGF basados en proteína descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpo anti-NGF, inmunoadhesina de TrkA, etc.). Por ejemplo, otros fragmentos del receptor TrkA que son capaces de bloquear (bloqueo parcial a completo) NGF y / o una actividad biológica de NGF se conocen en la técnica

En otra divulgación, el antagonista de NGF comprende al menos una inmunoadhesina de TrkA. Las inmunoadhesinas de TrkA como se usan en el presente documento se refieren a moléculas químicas solubles que comprenden el dominio extracelular de un receptor TrkA y una secuencia de inmunoglobulina, que retiene la especificidad de unión del receptor TrkA (sustancialmente retiene la especificidad de unión del receptor TrkA) y es capaz de unirse a NGF.

Las inmunoadhesinas de TrkA se conocen en la técnica, y se ha encontrado que bloquean la unión de NGF al receptor TrkA. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.153.189. Brennan y col. report administration of TrkA immunoadhesin in a rat model of post-surgical pain. Véase Society for Neuroscience Abstracts 24 (1-2) 880 (1998). En una divulgación, la Inmunoadhesina de TrkA comprende una fusión de la secuencia de aminoácidos del receptor TrkA (o una parte del mismo) del dominio extracelular de TrkA capaz de unirse a NGF (en algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que sustancialmente retiene la especificidad de unión del receptor TrkA) y una secuencia de inmunoglobulina. En una divulgación, el receptor TrkA puede ser una secuencia del receptor TrkA humana, y la fusión es con una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina es una secuencia del dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina. En otra divulgación, la asociación de dos fusiones de cadena pesada de receptor TrkA - inmunoglobulina (por ejemplo, mediante enlace covalente por enlace (s) disulfuro da como resultado una estructura de tipo inmunoglobulina homodimérica. Una cadena ligera de inmunoglobulina puede además estar asociada a una o ambas de las quimeras del receptor TrkA -inmunoglobulina en el dímero unido a sulfuro para producir una estructura homotrimérica o homotetramérica. Los ejemplos de inmunoadhesinas de TrkA adecuadas incluyen los

descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.153.189.

En otra divulgación, el antagonista de NGF comprende al menos un anticuerpo anti-TrkA capaz de bloquear, suprimir, alterar, y / o reducir la interacción física de NGF con el receptor TrkA y / o señalización hacia abajo, por lo cual una actividad biológica de NGF se reduce y / o se bloquea. Los anticuerpos anti-TrkA se conocen en la técnica

Los anticuerpos anti-TrkA ejemplares incluyen los descritos en las Publicaciones PCT Números WO 97/21732, WO 00/73344, WO 02/15924, y Publicación de Estados Unidos N° 20010046959.

En otra divulgación, el antagonista de NGF comprende al menos un anticuerpo anti-p75 capaz de bloquear, suprimir, alterar, y / o reducir la interacción física de NGF con el receptor p75 y / o señalización hacia abajo, por lo cual una actividad biológica de NGF se reduce y / o se bloquea.

- En otra divulgación, el antagonista de NGF comprende al menos un inhibidor de la quinasa capaz de inhibir la señalización de la quinasa hacia abajo asociado a la actividad del receptor TrkA y / o p75. Un inhibidor de la quinasa ejemplar es K252a o K252b, que se conoce en la técnica y se describe en Knusel y col., J. Neurochem. 59: 715 - 722 (1992); Knusel y col., J. Neurochemistry 57: 955 - 962 (1991); Koizumi y col., J. Neuroscience 8: 715 - 721 (1988); Hirata y col., Chemical Abstracts 111 : 728, XP00204135, véase el resumen y 12° Collective Chemical Substance Index, p. 34237, C. 3 (5-7), 55 - 60, 66 - 69), p. 34238, c.1 (41 - 44), c.2 45 (25 - 27, 32 - 33), p. 3423, c.3 (48 - 50, 52 - 53); y Patente de Estados Unidos N° 6.306.849.

Se espera que un número de otras categorías de antagonistas de NGF se identificarán si se busca por el clínico.

Identificación de antagonistas de NGF

- Los anticuerpos anti-NGF y otros antagonistas de NGF se pueden identificar o caracterizar usando procedimientos conocidos en la técnica, mediante lo cual se detecta y / o se mide la reducción, mejora, o neutralización de una actividad biológica de NGF. Se pueden usar los procedimientos descritos en el documento PCT WO 04/065560. Otro procedimiento, por ejemplo, un ensayo de la activación del receptor de quinasa (KI RA) descritos en las Patentes de Estados Unidos Números 5.766.863 y 5.891.650, se pueden usar para identificar los antagonistas de NGF. Este ensayo de tipo ELISA es adecuado para la medición cualitativa o cuantitativa de la activación de la quinasa mediante la medición de la autofosforilación del dominio de quinasa de una proteína tirosina quinasa del receptor (de aquí en adelante "rPTK"), por ejemplo, el receptor TrkA, así como para la identificación y caracterización de antagonistas potenciales de una rPTK seleccionada, por ejemplo, TrkA. La primera fase del ensayo implica la fosforilación del dominio quinasa de un receptor de quinasa, por ejemplo, un receptor TrkA, en el que el receptor está presente en la membrana celular de una célula eucariótica. El receptor puede ser un receptor endógeno o ácido nucleico que codifica el receptor, o una construcción del receptor, se puede transformar en la célula. Típicamente, una primera fase sólida (por ejemplo, un pocillo de una primera placa de ensayo) se reviste con una población sustancialmente homogénea de tales células (usualmente una línea celular de mamífero) de manera que las células se adhieren a la fase sólida. A menudo, las células son adherentes y por lo tanto se adhieren de manera natural a la primera fase sólida. Si se usa una "construcción del receptor", usualmente comprende una fusión de un receptor de quinasa y un polipéptido señalizador. El polipéptido señalizador se reconoce mediante el agente de captura, a menudo un anticuerpo de captura, en la parte ELISA del ensayo. Se añade después un analito, tal como un anticuerpo anti-NGF candidato u otro antagonista de NGFs, conjuntamente con NGF a los pocillos que tienen las células adherentes, de manera que el receptor de la tirosina quinasa (por ejemplo, receptor TrkA) se expone a (o se pone en contacto con) NGF y el analito. Este ensayo permite la identificación de anticuerpos (u otro antagonista de NGFs) que inhiben la activación de TrkA mediante su NGF ligando. Siguiendo la exposición a NGF y el analito, las células adherentes de solubilizan usando un tampón de lisis (que tiene un detergente solubilizante en él) y agitación moderada, liberando por lo tanto el lisado de células que se puede someter a la parte de ELISA del ensayo directamente, sin la necesidad de concentración o clarificación del lisado de células.

- El lisado de células así preparado está listo para someterse a la fase de ELISA del ensayo. Como una primera etapa en la fase de ELISA, una segunda fase sólida (usualmente un pocillo de una placa de microtitulación ELISA) se recubre con un agente de captura (a menudo un anticuerpo de captura) que se une de manera específica al receptor de la tirosina quinasa, o, en el caso de una construcción del receptor, al polipéptido señalizador. El recubrimiento de la segunda fase sólida se lleva a cabo de manera que el agente de captura se adhiere a la segunda fase sólida. El agente de captura es en general a anticuerpo monoclonal, pero, como se describe en los ejemplos en el presente documento, también se pueden usar anticuerpos policlonales. El lisado de células obtenido después se expone a, o se pone en contacto con, el agente de captura adherente de manera que el receptor o construcción del receptor se adhiere a (o se captura en) la segunda fase sólida. Después se lleva a cabo una etapa de lavado, de manera que se retire el lisado de células no unido, dejando el receptor capturado o construcción del receptor. El receptor adherente o capturado o construcción del receptor se expone después a, o se pone en contacto con, un anticuerpo antifosfotirosina que identifica los restos de tirosina fosforilados en el receptor de la tirosina quinasa. Como se describe en el presente documento, el anticuerpo antifosfotirosina se conjuga (directamente o indirectamente) a una enzima que cataliza un cambio de color de un reactivo de color no radiactivo. De acuerdo con lo anterior, la fosforilación del receptor se puede medir mediante un cambio de color posterior del reactivo. La enzima se puede unir al anticuerpo anti-fosfotirosina directamente, o una molécula de conjugación (por ejemplo, biotina) se puede conjugar al anticuerpo anti-fosfotirosina y la enzima se puede unir posteriormente al anticuerpo anti-fosfotirosina

mediante la molécula de conjugación. Finalmente, la unión del anticuerpo anti-fosfotirosina al receptor capturado o construcción del receptor se mide, por ejemplo, mediante un cambio de color en el reactivo de color.

El antagonista de NGF también se puede identificar mediante incubación de un agente candidato con NGF y controlando una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unión a NGF e inhibición de la actividad biológica de NGF y / o rutas hacia abajo mediadas por la función de señalización de NGF; (b) prevención, mejora, o tratamiento de cualquier dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso; (c) bloqueo o disminución de la activación del receptor de NGF (incluyendo dimerización y / o autofosforilación del receptor TrkA); (d) incremento de la eliminación de NGF; (e) inhibición de (reducción) de la síntesis producción o liberación de NGF. En una divulgación, un antagonista de NGF se identifica mediante la incubación de un agente candidato con NGF y controlando la unión y reducción o neutralización del asistente de una actividad biológica de NGF. El ensayo de unión se puede realizar con el (los) polipéptido (s) de NGF purificado (s), o con células que se expresan o se transfectan de manera natural, el (los) polipéptido (s) de NGF. En una divulgación, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitiva, donde se evalúa la capacidad del anticuerpo candidato para completar un antagonista de NGF para la unión de NGF. El ensayo se puede realizar en diversos formatos, incluyendo el formato ELISA. En otra divulgación, un antagonista de NGF se identifica mediante la incubación de un agente candidato con NGF y controlando la inhibición asistente de la dimerización del receptor TrkA y / o autofosforilación.

Después de la identificación inicial, la actividad del antagonista anti-NGF se puede además confirmar y refinar mediante bioensayos, conocidos para ensayar las actividades biológicas dirigidas. Como alternativa, se pueden usar bioensayos para seleccionar candidatos directamente. Por ejemplo, NGF promueve un número de cambios morfológicamente reconocibles en las células sensibles. Éstos incluyen, pero no se limitan a, promover la diferenciación de células PC 12 y que potencian el crecimiento de neuritas a partir de estas células (Greene and Tischler, Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos 73: 2424 - 2428 (1976); Urfer y col., Biochem. 36: 4775 - 4781 (1997); Tsoulfas y col., Neuron 10: 975 - 990 (1993)), promover el crecimiento hacia afuera de los explantes de ganglios sensoriales sensibles y simpáticos (Levi-Montalcini, R. y Angeletti, P. Nerve growth factor. Physiol. Rev. 48, 534 - 569, 1968) y promover la supervivencia de neuronas dependientes de NGF tales como neuronas del ganglio de la raíz embrionaria dorsal, del ganglio del trigémino, o del ganglio simpático (por ejemplo, Chun & Patterson, Dev. Biol. 75: 705 - 711, (1977); Buchman y Davies, Development 118: 989 - 1001, (1993). De este modo, el ensayo para la inhibición de la actividad biológica de NGF supone el cultivo de las células sensibles a NGF con NGF más un analito, tal como un anticuerpo candidato anti-NGF o un antagonista candidato de NGF. Después de un tiempo apropiado se ensayará la respuesta celular (diferenciación celular, crecimiento hacia fuera de neuritas o supervivencia de células).

La capacidad de un candidato del antagonista de NGF para bloquear o neutralizar una actividad biológica de NGF también se puede determinar mediante el control de la capacidad del agente candidato para inhibir la supervivencia mediada por NGF en el bioensayo de supervivencia de los ganglios de la raíz dorsal de rata de tipo embrionario como se describe en Hongo y col., Hibridoma 19: 215 - 227 (2000).

Composiciones para uso en los usos médicos de la invención

Las composiciones usadas en los usos médicos de la invención comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión de NGF humano a trkA y p75, y en algunas realizaciones, además comprenden un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición es para uso en cualquiera de los procedimientos y usos médicos descritos en el presente documento. Los ejemplos de tales composiciones, así como formular también se describen en la sección anterior y más abajo. En otra realización, la composición comprende uno o más antagonistas de NGF. En otra divulgación, la composición comprende uno o más antagonistas de NGF seleccionados de uno cualquiera o más de los siguientes: un antagonista (por ejemplo, un anticuerpo) que se une (interactúa físicamente con) el NGF, un antagonista que se une a un receptor NGF (tal como un receptor TrkA y/o receptor p75) y un antagonista que reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor NGF aguas abajo. En todavía otra divulgación, la composición comprende cualquier antagonista de NGF que no es una inmunohadesina de TrkA (es decir, es distinta de una inmunoadhesina de TrkA). En otra divulgación, la composición comprende cualquier antagonista de NGF que es distinto de un anticuerpo anti-NGF. En todavía otra divulgación, la composición comprende cualquier antagonista de NGF que es distinto de una inmunoadhesina de TrkA y distinto de un anticuerpo anti-NGF. En otra divulgación, un antagonista de NGF inhibe (reduce) la síntesis, la producción o la liberación de NGF. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF se une a NGF y no reacciona de manera cruzada de manera significativa con las neurotropina relacionadas (tales como NT3, NT4/5, y / o BDNF). En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no está asociado con una respuesta inmune adversa. En alguna divulgación, el antagonista de NGF se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-NGF, una molécula antisentido dirigida a un NGF (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica NGF), una molécula antisentido dirigida hacia un receptor de NGF (tal como trkA y/o p75), un compuesto inhibitorio de NGF, un análogo estructural de NGF, una mutación negativa dominante de un receptor TrkA que se une a un NGF, una inmunoadhesina de TrkA, un anticuerpo anti-TrkA, un anticuerpo anti-p75 y un inhibidor de quinasa. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF reconoce NGF humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es humano. En todavía otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF está humanizado (tal como el anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En todavía otra realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una región constante que no desencadena una respuesta inmune no deseada o indeseable, tal como lisis mediada por anticuerpo o ADCC. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF comprende uno o más CDR (s) del anticuerpo E3 (tales como uno, dos,

tres cuarto, cinco, o, en algunas realizaciones, las seis CDR de E3).

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

La composición usada en la presente invención puede además comprender vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. (2000) Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover.), en la forma de soluciones acuosas de formulaciones liofilizadas. Los vehículos, excipientes, o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones usadas, y pueden comprender tampones fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y / o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilen glicol (PEG). Los excipientes farmacéuticamente aceptables se describen además en el presente documento.

El antagonista de NGF y composiciones del mismo se pueden usar junto con otros agentes que sirven para potenciar y / o complementar la eficacia de los agentes. En algunas realizaciones, el otro agente es un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el otro agente es un AINE. En algunas realizaciones, estos agentes no son analgésicos opioides. En algunas realizaciones, estos agentes no son AINE.

Kits

La divulgación también proporciona kits para su uso en los presentes usos médicos y procedimientos. Los Kits de la divulgación incluyen uno o más recipientes que comprenden un antagonista de NGF (tal como un anticuerpo, tal como el anticuerpo E3 humanizado descrito en el presente documento), y en alguna divulgación, además comprenden instrucciones para uso de acuerdo con cualquiera de los usos médicos de la invención descritos en el presente documento. En alguna divulgación, el antagonista de NGF es cualquier antagonista de NGF descrito en el presente documento. En todavía otra divulgación, el kit comprende un antagonista de NGF que no es una inmunoadhesina de TrkA (es decir, es distinto de una inmunoadhesina de TrkA). En otra divulgación, el kit comprende un antagonista de NGF que es distinto de un anticuerpo anti-NGF. En todavía otra divulgación, el kit comprende cualquier antagonista de NGF que es distinto de una inmunoadhesina de TrkA y distinto de un anticuerpo anti-NGF. En alguna divulgación, el kit comprende un anticuerpo anti-NGF (tal como anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En alguna divulgación, el kit comprende un anticuerpo anti-NGF que comprende una o más CDR (s) de anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o, en algunas realizaciones, las seis CDR de E3). En alguna divulgación, el kit incluye un analgésico opioide. En alguna divulgación, el kit incluye un AINE. En alguna divulgación, el kit no incluye un analgésico opioide. En alguna divulgación, el kit no incluye un AINE. En alguna divulgación, las instrucciones incluidas comprenden una descripción de la administración del anticuerpo antagonista anti-NGF para tratar, mejorar o prevenir dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. El kit puede además comprender una descripción de seleccionar un individuo adecuado para el tratamiento basado en la identificación del individuo que tiene dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso o si el individuo está en riesgo de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso. En todavía otras divulgaciones, la instrucción comprende una descripción de la administración de un antagonista de NGF para tratar, prevenir y / o mejorar dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso. En todavía otras divulgaciones, las instrucciones comprenden una descripción de la administración de un antagonista de NGF a un individuo en riesgo de dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso. En alguna divulgación, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide. En alguna divulgación, el antagonista de NGF se co-administra con un AINE. En alguna divulgación, el antagonista de NGF se co-administra con un analgésico opioide y un AINE. En alguna divulgación, el antagonista de NGF no se co-administra con un analgésico opioide. En alguna divulgación, el antagonista de NGF no se co-administra con un AINE.

Las instrucciones que se refieren al uso de un antagonista de NGF en general incluyen información para la dosificación, programa de dosificación, y vía de administración para el tratamiento propuesto. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, Encases a granel (por ejemplo, envases multi-dosis) o dosis de subunidades. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención están típicamente escritas sobre una etiqueta o insertadas en

el envase (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), instrucciones que se pueden leer por máquina (por ejemplo, instrucciones que llevan un disco de almacenamiento magnético u óptico) son también aceptables.

La etiqueta o inserción en el envase indica que la composición se usa para tratar, mejorar y / o prevenir dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso. Las instrucciones se pueden proporcionar para poner en práctica cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Los kits de esta invención están en un envase adecuado. El envase adecuado incluye, pero no se limita a, viales, botellas, jarras, envase flexible (por ejemplo, bolsas Mylar de plástico), y similares. También se contemplan envases para uso en combinación con un dispositivo específico, tales como inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que se puede perforar por una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón que se puede perforar por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un antagonista de NGF, tal como un anticuerpo anti-NGF. El recipiente puede además comprender un segundo agente farmacéuticamente activo.

Los kits pueden opcionalmente proporcionar componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o inserción (es) en el envase (s) o asociado al recipiente.

En algunas divulgaciones, la invención proporciona artículos de fabricación que comprende contenidos de los kits descritos anteriormente. En algunas divulgaciones, el kits comprende un antagonista de NGF (tal como un anticuerpo anti-NGF) con información que indica el uso para tratar dolor de cáncer de hueso incluyendo dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso.

Administración de un antagonista de NGF y determinación del tratamiento

El antagonista de NGF se puede administrar a un individuo mediante cualquier vía adecuada. Por ejemplo, el antagonista de NGF se puede administrar por vía oral, intravenosa, sublingual, subcutánea, intraarterial, intrasínovial, intravescicular (tal como mediante la vejiga), intramuscular, intracardiaca, intratorácica, intraperitoneal, intraventricular, sublingual, mediante inhalación, mediante supositorio, y transdérmica. Se pueden administrar por vía oral, for ejemplo, en la forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, piruletas, chicles y similares preparados procedimientos reconocidos en la técnica. Debe ser evidente para los expertos en la técnica que los ejemplos descritos en el presente documento no se pretende que sean limitantes sino ilustrativos de las técnicas disponibles.

De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se administra a un individuo de acuerdo con procedimientos conocidos, tal como administración intravenosa, por ejemplo, en forma de un bolo mediante infusión continua durante un período de tiempo, mediante vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasínovial, intratecal, oral, inhalación o tópica. Los nebulizadores comercialmente disponibles para las formulaciones líquidas, incluyendo nebulizadores de chorro y nebulizadores ultrasónicos son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas se pueden nebulizar directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar después de la reconstitución. Como alternativa, el antagonista de NGF puede administrarse en forma de aerosol usando una formulación de fluorocarbono y un inhalador de dosis medida, o inhalarse en forma de un polvo liofilizado y molido.

En una realización, un antagonista de NGF se administra mediante técnicas de administración local específica dirigida al sitio o dirigida. Los ejemplos de técnicas de administración local específica dirigida al sitio o dirigida incluyen diversas fuentes de liberación prolongada implantables del antagonista de NGF o catéteres de administración local, tales como catéteres de infusión, un catéter permanente, o un catéter de aguja, injertos sintéticos, urdimbres adventicias, derivaciones y dilatadores vasculares permanente u otros dispositivos implantables, vehículos específicos al sitio, inyección directa, o aplicación directa. Véase, por ejemplo, Publicación PCT N° WO 00/53211 y la Patente de Estados Unidos N° 5.981.568.

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

En algunas realizaciones, estos agentes se formulan para la administración mediante inyección (por ejemplo, por vía intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). De acuerdo con lo anterior, estos agentes se pueden formular con vehículos farmacéuticamente aceptables tal como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, dosis, programación y repetición, dependerá del individuo particular y la historia médica del individuo.

Un anticuerpo anti-NGF se puede administrar usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo mediante inyección (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). Los anticuerpos anti-NGF también se pueden administrar mediante inhalación, como se describe en el presente documento. En general, para la administración de anticuerpos anti-NGF, una dosificación candidata inicial puede ser aproximadamente 2 mg/kg. Para el propósito de la presente invención, una dosificación diaria típica puede variar entre aproximadamente cualquiera de 0,1 µg/kg a 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg, a 30 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de síntomas o hasta que se logran los niveles terapéuticos suficientes para reducir dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso. Un régimen de dosificación ejemplar comprende la administración de una dosis inicial de aproximadamente 2 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 1 mg/kg del anticuerpo anti-NGF, o seguido de una dosis de mantenimiento de aproximadamente 1 mg/kg cada otra semana. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de mengua farmacocinética que el facultativo desee lograr. Por ejemplo, se contempla la dosificación desde una - cuatro veces a la semana. En algunas realizaciones, variando la dosificación entre aproximadamente 3 µg/mg y aproximadamente 2 mg/kg (tal como aproximadamente 3 µg/mg, aproximadamente 10 µg/mg, aproximadamente 30 µg/mg, aproximadamente 100 µg/mg, aproximadamente 300 µg/mg, aproximadamente 1 mg/kg, y aproximadamente 2 mg/kg) se puede usar. En algunas realizaciones, la frecuencia de dosificación es una vez cada semana, cada 2 semanas, cada 4 semanas, cada 5 semanas, cada 6 semanas, cada 7 semanas, cada 8 semanas, cada 9 semanas, o cada 10 semanas; o una vez cada mes, cada 2 meses, o cada 3 meses, o más. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación (incluyendo el antagonista (as) de NGF usado) puede variar con el tiempo.

En general, cuando no es un anticuerpo, un antagonista de NGF puede (en algunas realizaciones) administrarse a la tasa de aproximadamente 0,1 a 300 mg/kg del peso del paciente dividido en una a tres dosis, o como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones, para un paciente adulto de peso normal, pueden administrarse dosis que varían de aproximadamente 0,3 a 5,00 mg/kg. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, el tiempo y la repetición, dependerán del individuo particular y de la historia médica del individuo, así como las propiedades de los agentes individuales (tales como la vida media del agente y otras consideraciones bien conocidas en la técnica).

Para el propósito de la presente invención, la dosificación apropiada de un antagonista de NGF dependerá del antagonista de NGF (o composiciones del mismo) empleada, el tipo y gravedad del dolor a tratar, si el agente se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al agente, y la discreción del médico asistente. Típicamente el clínico administrará un anticuerpo anti-NGF, hasta que se alcanza una dosificación que logra el resultado deseado.

Las consideraciones empíricas, tal como semivida, en general contribuirán a la determinación de la dosis. Por ejemplo, anticuerpos que son compatibles con el sistema inmune humano, tales como anticuerpos humanizados o anticuerpos totalmente humanizados, se puede usar para prolongar la semivida del anticuerpo y para evitar que el anticuerpo esté atacado por el sistema inmune del huésped. La frecuencia de administración se puede determinar y ajustar durante el curso de la terapia, y en general, pero no necesariamente, se basa en el tratamiento y / o supresión y / o mejora y / o retraso del dolor. Como alternativa, las formulaciones de liberación continua sostenida de los anticuerpos anti-NGF pueden ser apropiadas. se conocen en la técnica diversas formulaciones y dispositivos para lograr la liberación sostenida.

En una realización, las dosificaciones de un antagonista de NGF se pueden determinar de manera empírica en individuos a los que se les ha proporcionado una o más administración (es) de antagonista de NGF. Los individuos se proporcionan en dosis crecientes de antagonista de NGF, por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF. Para determinar la eficacia de un antagonista de NGF, se puede usar un indicador de dolor.

La administración de un antagonista de NGF de acuerdo con el uso médico en la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, si el propósito de la administración es terapéutica o profiláctica, y otros factores conocidos por los facultativos. La administración de un anticuerpo anti-NGF puede ser esencialmente continua durante un período de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciada, por ejemplo, o bien antes, durante, o después del desarrollo del dolor; antes; durante; antes y después; durante y antes; antes y durante; o antes, durante, y después del desarrollo del dolor. La administración puede ser antes, durante y / o después de que el cáncer tenga metástasis al hueso, y cualquier otro episodio que probablemente da lugar a dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso.

En algunas realizaciones, más de un antagonista de NGF, tal como un anticuerpo, puede estar presente. El antagonista puede ser igual o diferente entre sí. Al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco de los antagonistas de NGF puede estar presente. En general, los antagonistas de NGF tienen actividades complementarias de manera que no afecte de manera adversa entre sí. Los antagonistas de NGF también se pueden usar junto con otros agentes que sirven para potenciar y / o complementar la eficacia de los agentes. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un analgésico opioide. En algunas realizaciones, el antagonista de NGF no se co-administra con un AINE.

Las formulaciones terapéuticas del antagonista de NGF (tales como un anticuerpo) usadas de acuerdo con la presente invención se preparan para almacenamiento mediante la mezcla de un anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing (2000)), en la forma de soluciones acuosas o formulaciones liofilizadas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y puede comprender tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; sales tales como cloruro de sodio; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y / o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilén glicol (PEG).

Los liposomas que contienen el antagonista de NGF (tal como un anticuerpo) se preparan mediante los procedimientos conocidos en la técnica, tales como se describe en Epstein, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 82: 3688 (1985); Hwang, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 4030 (1980); y las Patentes de Estados Unidos Números 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo de circulación potenciado se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556. Particularmente los liposomas útiles se pueden generar mediante un procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extrusionan a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metil-metacrilato) microcápsulas, respectivamente, en sistemas de distribución de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing (2000).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, dichas matrices están en la forma de artículos configurados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o alcohol polivinílico), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y 7 etil-L-glutamato, etilén-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico - ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico - ácido glicólico y acetato de leuprolida), sacarosa acetato isobutirato, y ácido poli-D- (-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo*. Esto se lleva a cabo fácilmente, por ejemplo, filtración a través de membranas de filtración estéril. Las composiciones de anticuerpo anti-NGF terapéuticas se colocan en general en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón que se puede perforar mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Las composiciones de acuerdo con la presente divulgación pueden estar en formas de dosificación unitaria tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones, o supositorios, para la administración oral, parenteral o rectal, o administración mediante inhalación o insuflación.

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el principal ingrediente activo se mezcla con un vehículo farmacéutico, por ejemplo, ingredientes de formación de comprimidos convencionales tales como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención, o su sal farmacéuticamente aceptable no tóxica. Cuando se refiere a estas composiciones de preformulación como homogénea, significa que el ingrediente activo se dispersa eventualmente a través de la composición de manera que la composición se puede fácilmente subdividir en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta composición

de preformulación sólida después se subdivide en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente que contiene entre 0,1 y aproximadamente 500 mg del ingrediente activo de la presente invención. Los comprimidos o píldoras de la composición novedosa se pueden recubrir o de otra manera combinar para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender una dosificación interna y un componente de dosificación exterior, estando lo último en la forma de una envuelta sobre lo anterior. Los dos componentes se pueden separar mediante una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente inerte pase intacto al duodeno o se retrase en la liberaciones pueden usar una diversidad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales un número de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Los agentes tensioactivos adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos, tales como polioxietilensorbitanos (por ejemplo Tween™ 20, 40, 60, 80 ó 85) y otros sorbitanos (por ejemplo, Span™ 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente tensioactivo de manera conveniente comprenderá entre 0,05 y 5% de agente tensioactivo y puede estar entre 0,1 y 2,5%. Se apreciará que todos los ingredientes se pueden añadir, por ejemplo manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables, si es necesario.

Se pueden preparar emulsiones adecuadas usando emulsiones de grasa comercialmente disponibles, tal como Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ y Lipiphysan™. El ingrediente activo se puede o bien disolver en una composición de emulsión mezclada previamente o como alternativa se puede disolver en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de maíz, o aceite de almendra) y una emulsión formada tras la mezcla con un fosfolípido (por ejemplo, fosfolípidos de huevo, fosfolípido de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que se pueden añadir otros ingredientes, por ejemplo glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas típicamente contendrán hasta 20% de aceite, por ejemplo, entre 5 y 20%. La emulsión de grasa puede comprender gotitas de grasa entre 0,1 y 1,0 μm , particularmente 0,1 y 0,5 μm , y tienen un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0.

Las composiciones de emulsión pueden ser las preparadas mediante la mezcla de un antagonista del factor del factor de crecimiento neuronal con Intralipid™ de sus componentes (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, disolventes acuosos u orgánicos, o sus mezclas, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables como se ha establecido anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran mediante las vías oral o nasal respiratoria para efecto local o sistémico. Las composiciones en disolvente farmacéuticamente aceptables preferiblemente estériles se pueden nebulizar mediante el uso de gases. Las soluciones nebulizadas se pueden aspirar directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede estar unido a una máscara de cara, máquina de respiración de presión positiva estable o intermitente. Se pueden administrar composiciones en solución, suspensión o polvo, preferiblemente por vía oral o nasal, a partir de los dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada.

La eficacia de tratamiento se puede determinar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Ejemplos

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

Ejemplo 1

Anticuerpo monoclonal Anti-NGF es eficaz en el tratamiento de dolor de cáncer asociado a metástasis de hueso

Los inventores usaron un modelo de dolor de cáncer de hueso murino para determinar la eficacia de tratamiento con anticuerpo anti-NGF 911 (un anticuerpo monoclonal de ratón; véase Hongo, y col, Hibridoma 19:215-227 (2000)). Este modelo murino de dolor de cáncer de hueso se desarrolla mediante inyección intramedular de células de sarcoma osteolítico en el fémur del ratón y después el orificio de la aguja se llena con amalgama dental para confinar el tumor al hueso. Véase Schwei y col, J. Neuroscience 19:10886 - 10897 (1999); y Luger y col, dolor 99: 397 - 406 (2002). Los experimentos en ratones machos adultos C3H/HeJ (Laboratorios Jackson, Bar Harbor, ME). El día 0, se realizó una artrotomía después de la inducción de anestesia general con pentobarbital de sodio (50 mg/kg, intraperitoneal (i. p.)). Se insertó una aguja en el canal medular para crear una ruta para las células de sarcoma. Después se realizó una depresión usando una pieza de mano de alta velocidad dental. Además de los animales desnudos (n = 5), animales tratados de forma simulada (n = 5) se generaron con una inyección de medio esencial mínimo α (20 μl , Sigma, St. Louis, MO) en el espacio intramedular del fémur (designado de forma simulada) mientras que los animales de sarcoma (n = 5 para cada condición ensayada se inyectaron con medio que contenía 10^5 de células de sarcoma osteolítico 2472 (designado sarcoma o sarc) (20 μl , ATCC, Rockville, MD). Para todos los animales, el sitio de inyección se selló con un tampón de amalgama dental para confinar las células o medio inyectado dentro del canal intramedular y seguido de irrigación con agua estéril (solución hipotónica). Finalmente, se

logró el cierre de la incisión con grapas de herida. Las grapas se retiraron el día 5 para que no interfiriera con el ensayo de comportamiento. Se trató un segundo grupo de animales inyectados con sarcoma con anti-NGF (10 mg/kg, i. p.) los días 6 y 13.

Análisis de comportamiento. Los animales se ensayaron para valorar los comportamientos relacionados con dolor el día 10 y el día 14 después del implante del tumor. Los animales se ensayaron para evaluar el comportamiento usando los siguientes ensayos: dolor continuado (rigidez y estremecimiento espontáneo); dolor ambulatorio (uso del miembro y rotarod), y el dolor provocado por el movimiento (rigidez provocada por palpación y estremecimiento provocado por palpación). Los animales se colocaron en una caja de observación de plástico transparente con un suelo de malla de alambre y se dejaron habituar durante un período de 30 min. Después de la aclimatación, se determinaron la rigidez espontánea, estremecimiento espontáneo, uso del miembro durante la ambulación normal en un campo abierto, y rigidez durante la ambulación forzada. La rigidez provocada por palpación y estremecimiento se midieron después del período de 2 min de palpación normalmente no nociva del fémur distal en animales inyectados con sarcoma y de forma simulada.

Se registró el número de estremecimientos espontáneos y tiempo para pasar la rigidez, representativo de comportamiento nociceptivo, se registraron de manera simultánea durante un período de observación de 2 min. La rigidez se definió como el tiempo que la pata trasera se mantuvo arriba en ambulatorio y estremecimientos era el número de veces que el animal mantuvo el miembro arriba.

El uso del miembro normal durante la ambulación espontánea se puntuó en una escala de 5 a 0: (5) uso normal, y (0) pérdida completa del uso del miembro.

La rigidez ambulatoria forzada se determinó usando un rotarod (Columbus Instruments, Columbus, OH). La máquina de rotarod tiene una barra giratoria y está equipada con controles de velocidad, aceleración, y sensibilidad. Los animales se colocaron en la barra con X 4 de velocidad, 8,0 de aceleración, y 2,5 de sensibilidad. La rigidez ambulatoria forzada se tasó en una escala de 5 - 0: (5) uso normal, y (0) pérdida completa de uso.

Después de una palpación normalmente no nociva del fémur distal en animales cada segundo durante 2 min, los animales se colocaron en la caja de observación y su rigidez inducida por palpación y estremecimiento inducido por palpación se midieron durante 2 minutos adicionales

Tratamiento con anticuerpo anti-NGF. El día 6 y el día 13, los animales inyectados con sarcoma se inyectaron por vía intraperitoneal (i. p.) se inyectaron con anticuerpo anti-NGF 911 a 10 mg/kg (sarc + anti-NGF, n = 5), o animales inyectados con sarcoma y tratados de forma simulada se inyectaron (i. p.) con solución salina (tratados de forma simulada + veh o sarc + veh, n = 5 para cada condición). Todos los animales se analizaron para determinar su comportamiento los días 10 y 14.

Evaluación de comportamientos de dolor continuado. Como se muestra en la Figura 1, los animales inyectados con sarcoma (administrados con solución salina) desarrollaron comportamiento de dolor continuado como sed determina mediante la rigidez espontánea y estremecimiento espontáneo (ambos $p < 0,05$, ANOVA) cuando se compara con los animales inyectados de forma simulada con solución salina). Figura 1 también muestra que la administración i. p. de anticuerpo anti-NGF 911 de manera significativa redujo la rigidez espontánea y estremecimiento en ratones inyectados con sarcoma el día 10 y el día 14 después del implante de sarcoma cuando se compara con la administración de solución salina a ratones inyectados con sarcoma ($p < 0,05$, ANOVA, para tanto la rigidez espontánea como estremecimiento espontáneo). Estos resultados indican que el anticuerpo anti-NGF 911 reduce el dolor continuado en ratones inyectados con sarcoma.

Evaluación de comportamientos de dolor ambulatorio. Como se muestra en la Figura 2, los animales inyectados con sarcoma (administrados con solución salina) desarrollaron comportamientos de dolor ambulatorio como se determina mediante el uso del miembro y rigidez ambulatoria forzada (rotarod) (ambos $p < 0,05$, ANOVA) cuando se compara con los animales inyectados de forma simulada (administrados con solución salina). Figura 2 también muestra que la administración i. p. de anticuerpo anti-NGF 911 incrementó de manera significativa (cerca de lo normal) la puntuación del uso del miembro y la puntuación de rigidez forzada en los ratones inyectados con sarcoma el día 10 y el día 14 después de la implantación del sarcoma cuando se compara con la administración de solución salina a ratones inyectados con sarcoma ($p < 0,05$, ANOVA, para tanto el uso del miembro como la rigidez) de ambulatoria forzada. Estos resultados indican que el anticuerpo anti-NGF 911 reduce el dolor ambulatorio en ratones inyectados con sarcoma.

Evaluación de comportamientos de dolor provocado por tocamiento. Como se muestra en la Figura 3, animales inyectados con sarcoma (administrados con solución salina) desarrollaron comportamientos de dolor provocado por tocamiento como se determina mediante rigidez inducida por palpación y estremecimiento inducido por palpación (ambos $p < 0,05$, ANOVA) cuando se compara con los v inyectados tratados de forma simulada (administrados con solución salina). Figura 3 también muestra que la administración i. p. de anticuerpo anti-NGF 911 de manera significativa redujo la rigidez inducida por palpación y estremecimiento inducido por palpación en ratones inyectados con sarcoma el día 10 y el día 14 después de la implantación de sarcoma cuando se compara con la administración de solución salina a ratones inyectados con sarcoma ($p < 0,05$, ANOVA, para tanto la rigidez inducida por palpación

como estremecimiento inducido por palpación). Estos resultados indican que el anticuerpo anti-NGF 911 reduce el dolor provocado por tocamiento en ratones inyectados con sarcoma.

Ejemplo 2

Anticuerpo monoclonal Anti-NGF es eficaz en el tratamiento de dolor de cáncer de hueso y reduce varios cambios neuroquímicos asociados a sensibilización periférica y central en el ganglio de la raíz dorsal y médula espinal

Procedimientos

Animales. Se realizaron experimentos sobre un total de 158 ratones macho adultos C3H/HeJ (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME), que pesan entre 20 – 25 g. Los ratones se alojaron de acuerdo con las directrices de National Institutes of Health en condiciones sin patógenos (SPF) en jaulas autoclavadas mantenidas a 22°C con un ciclo de luz oscuridad alternativo de 12 horas y se les proporcionó alimento autoclavado y agua *ad libitum*.

Cultivo e inyección de células tumorales. Se obtuvieron las células de sarcoma de tipo murino osteolíticas (NCTC 2472, ATCC, Rockville, MD), transfectadas de manera estable con proteína fluorescente verde (GFP) y se mantuvieron como se ha descrito previamente por Sabino y col., Cancer Res. 62: 7343 - 9 (2002).

La inyección de células tumorales se realizó como se ha descrito previamente. Honore y col., Nat. Med. 6: 521-8 (2000); Honore y col., Neuroscience 98: 585 - 598 (2000); Luger y col., Cancer Research 61: 4038 - 4047 (2001). En resumen, después de la inducción de anestesia general con pentobarbital de sodio (50 mg/kg, i. p.), se realizó una artrotomía exponiendo los cóndilos del fémur distal. Solución salina estéril tamponada de Hank (HBSS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; 20 µl; de forma simulada, n = 40) o media que contenía 10⁵ de células de sarcoma de tipo murino osteolíticas (20µl, NCTC 2472, ATCC, Rockville, MD; sarcoma, n = 90) se inyectó en el espacio intramedular del fémur de ratón y el sitio de inyección se selló con amalgama dental (Dentsply, Milford, DE), seguido de irrigación con agua filtrada estéril. Se usó un día 14 de punto final, en este momento cuando el tumor todavía el tumor está todavía confinado al hueso y existe una presentación máxima de comportamientos de dolor relacionados con cáncer y cambios máximos en la expresión de marcadores neuroquímicos de la sensibilización periférica y central. Los animales tratados de forma simulada se usaron para análisis de control de cambios neuroquímicos e histología de hueso, ya que los animales no expuestos no eran diferentes de manera significativa en el comportamiento neuroquímicamente o histológicamente.

Tratamiento con anticuerpo anti-NGF. Para determinar el efecto del tratamiento del anticuerpo anti-NGF en los comportamientos de relacionados con el dolor, los cambios neuroquímicos, crecimiento de tumor y destrucción de hueso, el anticuerpo anti-NGF (mAb 911, descrito en Hongo, y col., Hibridoma 19: 215 - 227 (2000)) se administró (10 mg/kg/cada 5 días, i. p.) comenzando 6 días después de la inyección cuando era capaz de observarse la destrucción de hueso comenzada y terminada a los 14 días después de la inyección, cuando se observó comportamientos de destrucción de hueso y de dolor significativos. Las dosis usadas en el estudio actual no provocaron efectos adversos, tal como hipoalgesia, en ratones no expuestos. Para controlar la salud general de los ratones, se registraron los pesos al comienzo y fin de los experimentos.

Los ratones se colocaron al azar en grupos de tratamiento que recibían o bien solución salina estéril (tratados de forma simulada + vehículo: n = 28; sarcoma + vehículo: n = 35; 1,4 µl/g cada 5 días, i. p.) o un anticuerpo anti-NGF (tratados de forma simulada + anti-NGF; n = 4; sarcoma + anti-NGF: n = 23, 10 mg/kg/ cada 5 días, i. p.) semanalmente. Para comparación de comportamiento de anticuerpo anti-NGF con sulfato de morfina, se les proporcionó a los ratones una dosis de morfina 15 minutos antes del ensayo de comportamiento (no expuestos: n = 6; tratados de forma simulada más vehículo: n = 8; sarcoma + vehículo: n = 8; sarcoma + anti-NGF: n = 8; sarcoma + morfina 10 mg/kg, i. p.: n = 8; sarcoma + morfina 30 mg/kg, i. p.: n = 8). Para el ensayo de sensibilidad térmica y mecánica y determinación de la inervación de la piel de la pata trasera los ratones se dividieron en dos grupos de tratamiento que recibían solución salina estéril (no expuesto + vehículo: n = 11) o un anticuerpo anti-NGF (no expuesto + anti-NGF: n = 11, 10 mg/kg/ cada 5 días, i. p.) semanalmente durante 2 semanas.

Caracterización del anticuerpo anti-NGF. El Antagonista de anticuerpo de NGF (mAb 911) es eficaz en el bloqueo de la unión de NGF a los receptores Trk A y p75 de NGF e inhibir la autofosforilación de Trk A y bloqueo de la supervivencia dependiente de NGF de las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal. Hongo, y col., Hibridoma 19: 215 - 227 (2000).

Eutanasia y procesamiento de tejido. Se sacrificaron los ratones el día 14 después de la inyección de tumor y se procesaron los tejidos para análisis inmunohistoquímico de la médula espinal, ganglios de la raíz dorsal (DRG) como se ha descrito previamente y piel de la pata trasera. Honore y col., Nat. Med. 6: 521 - 8 (2000); Luger y col., Cancer Research 61: 4038 - 4047 (2001). En resumen, los ratones recibieron una estimulación mecánica normalmente no nociva de la rodilla inyectada 1,5 horas antes de la eutanasia para la inducción de la expresión c-Fos. Honore y col., Neuroscience 98: 585 - 598 (2000); Hunt y col., Nature 328: 632 - 634 (1987). Después de esta manipulación, los ratones se sacrificaron con CO₂ y se perfundieron por vía intracardiaca con 12 ml de 0.1 M solución salina tamponada con fosfato (PBS) seguido de 25 ml de solución de formaldehído al 4% /ácido pírico al 12,5%.

Se retiraron segmentos de la médula espinal (L2-L4), DRG (L1-L5) y piel plantar, después se fijaron en la fijación de perfusión y se protegieron por frío en sacarosa al 30% durante 24 horas. Secciones de médula espinal y de piel congeladas en serie, de 60 µm de espesor, se cortaron en un microtomo, se recogieron en PBS y se procesaron como secciones flotantes libres. Las secciones en serie de DRG, 15 µm de espesor, se cortaron en un criostato y se montaron congeladas sobre portaobjetos recubiertos de gelatina para procesamiento.

Después de hacer las secciones, las secciones DRG, médula espinal y piel plantar se enjuagaron brevemente en PBS y después se incubaron en solución de bloqueo (3% de suero de burro normal (NOS) 0,3% de Triton X-100 en PBS) durante 1 hr seguido de la incubación durante toda una noche en el anticuerpo primario. Las secciones de la médula espinal se inmunotifieron para proteína c-Fos (1:2000, Oncogene Research, San Diego, CA) y dinorfina (anti-dinorfina policlona, de cobaya 1:1.000, Neuromics, Minneapolis, MN). Las secciones de DRG se inmunotifieron para determinar la activación del factor 3 de transcripción (ATF-3) (anti-ATF-3 policlona de conejo, 1:500, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) y CD68 (ED-1; anti-CD68 policlona de rata, 1:5.000, Serotec, Raleigh, NC). Las secciones de piel se inmunotifieron para determinar el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (1:15.000; Sigma, St. Louis, MO), tirosina hidroxilasa (TOH) (anti-TOH policlona de conejo, 1:2.000, Chemicon, Temecula, CA) y neurofilamento H (Clon RT97) (anti-RT-97 policlona de conejo, 1:2.500, Chemicon, Temecula, CA).

Después de la incubación en anticuerpo primario, se enjuagaron las secciones en PBS y después se incubaron en el anticuerpo secundario durante 3 hr. Los anticuerpos secundarios, se conjugaron a Cy3 o biotina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), se usaron a 1:600 ó 1:500 respectivamente. Para detectar anticuerpos secundarios conjugados a biotina: después de la incubación secundaria, se enjuagaron las secciones en PBS y se incubaron en estreptavidina conjugada a Cy3 (1:4000; Jackson ImmunoResearch) durante 45 minutos. Para confirmar la especificidad de los anticuerpos primarios, los controles incluían la omisión del anticuerpo primario o preabsorción con el péptido sintético correspondiente. Después de los procedimientos de inmunotinción, se montaron secciones de médula espinal, piel plantar sobre portaobjetos recubiertos de gelatina. Las secciones montadas de piel, médula espinal y DRG se deshidrataron después en gradientes de alcohol (70, 90, 100%), se clarificaron en xileno y los cubreobjetos se montaron en DPX (Fluka, Suiza).

Después del examen radiológico, el día 14, la femoral derecha (control interno) e izquierda (que tiene tumor) se fijaron en ácido pícrico y 4% de formalina a 4°C durante toda una noche y se descalcificó en 10% de EDTA (Sigma, St. Louis, MO) durante no más de 14 días. Después los huesos se incrustaron en parafina. Las secciones femorales de, 5 µm de espesor se cortaron en plano lateral y se tiñeron con fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y hematoxilina y eosina (H y E) para visualizar las características histológicas de la médula ósea normal, tumor, osteoclastos y macrófagos. Para visualizar las células de sarcoma que usan microscopía de fluorescencia, secciones de femoral de 5 µm de espesor se tiñeron con un anticuerpo enjuagado contra la proteína fluorescente verde (GFP) (anti-GFP de conejo, 1:6.000, Molecular Probes, Eugene, OR). Se realizó la tinción con GFP usando el Sistema TSA - más Cianina 3 (PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, MA), como se ha descrito previamente por Sevcik y col., Pain 111: 169 - 80 (2004).

El análisis inmunohistoquímico de la femoral tratados de forma simulada y cancerosa se realizó sobre secciones en serie de 14 µm incrustadas en parafina. Se usó el sistema de Amplificación de Señal de Tiramina (TSA) (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA) para amplificar los anticuerpos marcados con Cy3. Se inactivaron las peroxidasas endógenas mediante la incubación de las secciones en 2% de peróxido de hidrógeno durante 1 hora. Después las secciones se aclararon tres veces con PBS durante 10 minutos y se bloquearon en tampón de bloqueo TSA durante 1 hora. Se añadió antisuero primario tras la retirada del tampón de bloqueo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante toda una noche. Las fibras nerviosas sensoriales aferentes primarias no mielinizadas y débilmente mielinizadas se marcaron usando un anticuerpo enjuagado contra el péptido relacionado con el gen anti-calcitonina policlona de conejo (CGRP) (1:15.000; Sigma). Las secciones se enjuagaron tres veces en tampón de lavado TSA durante 10 minutos seguido de una incubación de 45 minutos en estreptavidina HRP (1:4.000). Las secciones se enjuagaron después tres veces en tampón de lavado TSA durante 10 minutos. Se aplicó tiramina conjugada a CY3 (1:600) a la femoral durante 7 minutos, se lavó dos veces con tampón de lavado TSA y una vez con PBS. Finalmente, las secciones se secaron al aire, se deshidrataron mediante un gradiente de alcohol (70, 90 and 100%), se aclararon en xileno y se montaron con DPX (Fluka).

Análisis radiográfico y proliferación de osteoclastos y de macrófagos de hueso. Radiografías (Faxitron X-ray Corp., Wheeling, IL) de femoral diseccionada se obtuvieron en el momento del día 14 para determinar de manera óptima la destrucción de hueso. Se capturaron las imágenes sobre película de mamografía Kodak Min-R 2000 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY; tiempos de exposición: 7 seg, 21 kVp). El grado de la destrucción de hueso femoral inducida por tumor se determinó de manera radiográfica en el plano lateral de imágenes de hueso entero a ampliación de 5 X usando una escala de 0 a 5 (0, hueso normal sin signos de destrucción y 5, pérdida de hueso bicortical completa de espesor). Honore y col., Nat. Med. 6: 521 - 8 (2000); Honore y col., Neuroscience 98: 585 - 598 (2000); Luger y col., Cancer Research 61: 4038 - 4047 (2001).

La proliferación de osteoclastos y macrófagos asociados a tumor (TAMs) se determinó mediante la cuantificación del número de TRAP+ osteoclastos o TAMs en las secciones de femoral refijas con TRAP como se ha descrito previamente. Honore y col., Nat. Med. 6: 521 - 8 (2000); Honore y col., Neuroscience 98: 585 - 598 (2000). En resumen, TAM de diferencian histológicamente de las secciones de osteoclastos sobre las secciones femorales

teñidas con TRAP como TRAP + células que están libres y multidimensionalmente dispersadas en toda la masa tumoral. Los macrófagos dentro del hueso se llegan a activar debido a los factores liberados de tumor que estimulan las células, y la aparición celular de TAM activadas se marca mediante su superficie altamente irregular, lamelipodia múltiple y vacuolas fagocíticas. Los osteoclastos están histológicamente diferenciados como células que aparecen TRAP+ y que están estrechamente asociadas a regiones de resorción de hueso. Estas células están multinucleadas y se encuentran junto con el hueso cortical y trabecular. Los resultados se expresan como el número medio de osteoclastos por mm o TAM por mm², respectivamente.

Cuantificación de crecimiento tumoral. La femoral que contiene células de sarcoma que expresan GFP se representaron en imágenes usando un filtro de emisión de color amarillo de 515 nm de longitud sobre un microscopio de fluorescencia Nikon E600 equipado con una cámara digital SPOT II que utiliza un software de captura de imagen POT (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI). El área total del espacio intramedular y el porcentaje de espacio intramedular ocupado por el tumor se calcularon usando el software Image Pro Plus v3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Sabino y col., Cancer Res. 62: 7343 - 9 (2002); Sevcik y col., Pain 111: 169 - 80 (2004). Las características del tumor de las células de sarcoma transfectadas con GFP, tales como velocidades de crecimiento, velocidad de resorción de hueso y la capacidad de inducir comportamientos de dolor relacionados con cáncer, eran temporalmente, de forma de comportamiento y físicamente idénticas, a las células de sarcoma no transfectadas. Sabino y col., Cancer Res. 62: 734 3- 9 (2002).

Cuantificación de fibras sensoriales en hueso. El número de fibras nerviosas sensoriales se determinó como se ha descrito previamente. Mach y col., Neuroscience 113: 155 - 66 (2002). En resumen, se cuantificó el número de fibras nerviosas positivas a CGRP en tres regiones de hueso (proximal, distal y diafisial) y tres tejidos de hueso (periostio, hueso mineralizado y médula) Solamente las fibras nerviosas mayores que 30 µm de longitud se incluyeron en el análisis. Se analizaron seis secciones por animal, y sus fibras contadas se expresaron como área de hueso total.

Cuantificación de médula espinal, ganglio de la raíz dorsal y piel de la pata trasera. La médula espinal marcada de manera fluorescente, DRG y secciones de tejido de piel se analizaron usando o bien sistema de formación de imágenes confocal MRC 1024 (Bio-Rad, Filadelfia, PA), o una cámara digital SPOT II sobre un microscopio de fluorescencia Olympus BX-60 con el software de captura de imágenes SPOT Diagnostic Instruments, Inc.).

El número de neuronas DRG que expresan la activación del factor 3 de transcripción (ATF-3) se contaron con una amplificación de 200 x con una malla de ocular de 1 cm². Se determinó el número total de neuronas (pequeñas, medio y grande) mediante recuento de tanto los cuerpos neuronales (cuerpos de células no marcados que muestran una etiqueta de antecedente que se puede examinar mediante una rodamina o filtro FITC) y los resultados se expresan como por ciento del número total de neuronas que expresan la inmunorreactividad de ATF-3 (IR). Para evitar el recuento duplicado de los cuerpos celulares neuronales, los recuentos se llevaron a cabo sobre cada cuarta sección en serie para cada marcador. Para cuantificar los macrófagos activados o de infiltración en DRG, se obtuvieron imágenes a escala de gris de cámara SPOT sobre un mínimo de cuatro secciones ipsilaterales y contralaterales de DRG por animal y se analizaron usando el software Image Pro Plus versión 3.0 (Media Cybernetics). Para cada imagen, las regiones de la DRG que contiene solamente cuerpos de células de neuronas sensoriales (excluyendo nervio periférico) se perfilaron. Aunque se ve en el monitor, los umbrales superiores e inferiores de la densidad del nivel gris se establecieron de manera que solamente se discriminaron los perfiles celulares específicos de CD68-1 R del fondo en la DRG perfilada. El número de perfiles celulares se contó por sección de manera automática. La salida de la cámara SPOT se había calibrado en Image Pro Plus de manera que el área real de cada región perfilada, dentro de las imágenes adquiridas se pueden determinar. Los valores de sección de los perfiles celulares de CD68-1 R y áreas perfiladas se suman para cada animal y los resultados se expresan como número total de perfiles celulares de CD68-IR por área unitaria (mm²).

La cuantificación se llevó a cabo en secciones médula espinal a los niveles lumbares L2- L4 ya que estos segmentos espinales recibieron entrada aferente significativa de las DRG L1 - L3, que son los ganglios principales que proporcionan una entrada aferente al fémur de ratón. Edoff y col., Cell & Tissue Research 299: 193 - 200 (2000); Molander C, J. Comp. Neurol. 260: 246 - 255 (1987); Puigdemívil-Sánchez A y col., the Anatomical Record 260: 180 - 188 (2000); Puigdemívil-Sánchez A y col., Neurosci. Lett. 251: 169 - 172 (1998). La cuantificación de las secciones de médula espinal para dinorfina se obtuvo a partir de 4 secciones de médula espinal 4 seleccionadas al azar por animal. Se contó el número de neuronas dinorfina-IR en las láminas de médula espinal III-VI a un aumento de 100 x y se expresaron como número de neuronas por 60 µm de sección de L2-L4 por animal. Se contó el número de neuronas de c-Fos-IR en las láminas del asta dorsal III-VI en 8 secciones de la médula espinal coronal L3/L4 por animal. Para considerar c-Fos-IR, el umbral de inmunofluorescencia del perfil nuclear se estableció en tres veces el nivel de inmunofluorescencia medio anterior de la sección del tejido. Los resultados se proporcionan como número medio de neuronas de c-Fos -IR por sección de médula espinal.

La cuantificación de densidad de inervación epidérmica se realizó sobre 4 secciones de la piel de la planta de la pata trasera seleccionadas por animal. El número total de fibras nerviosas CGRP, TOH y RT97-IR se contó a una amplificación de 200 x. Se establecieron las reglas de conteo para contar solamente las fibras intraepidérmicas y ramas múltiples de la misma fibra. McCarthy y col., Neurology 45: 1848 - 55 (1995). La longitud total de epidermis en todas las secciones cuantificadas se midieron usando una rejilla ocular de 1 cm². Solamente se contaron las fibras nerviosas que tenían al menos 25 µm de longitud, y se proyectan en la epidermis superficial. Los resultados se

proporcionan como el número medio de fibras nerviosas intraepidérmicas por mm de longitud por animal.

Análisis de comportamiento. Se ensayaron los ratones para evaluación de dolor de comportamientos relacionados con cáncer de hueso 10 y 14 días después de las inyecciones de tumor tratados de forma simulada o inyecciones de tumor cuando los comportamientos de dolor son evidentes de manera significativa para la eficacia del tratamiento de anti-NGF. El tratamiento de anti-NGF se comparó con el tratamiento de morfina (Baxter, Deerfield, IL; 10 mg/kg, i.p.) y se administró 15 minutos antes del ensayo de comportamiento para asegurar que los animales se ensayaron dentro de la ventana terapéutica de la acción de fármaco. Hasselstrom y col., *Pharmacology and Toxicology* 79: 40 - 6 (1996).

Los ratones también se ensayaron 8, 10, 12 y 14 días después de las inyecciones de tumor tratados de forma simulada para determinar la eficacia de tratamiento de anti-NGF (10 mg/kg/cada 5 días, i.p.) en la atenuación de los comportamientos relacionados con el dolor a lo largo de la progresión de la enfermedad. Los animales se observaron durante un período de 2 minutos y se analizaron los comportamientos de dolor continuado y provocado por palpación, como se ha descrito previamente. Luger y col., *Cancer Research* 62: 7343 - 9 (2002); Sabino y col., *Cancer Research* 62: 7343 - 9 (2002); Sabino y col., *International Journal of Cancer* 104: 550 - 558 (2003). En resumen, el número de estremecimientos de las patas traseras y rigidez pasada con el tiempo se registraron como mediciones del dolor continuado, ya que éstas miden los pacientes reflejados en un establecimiento clínico con cáncer de hueso que protegen o difieren su miembro que tiene tumor. En nuestro modelo, el dolor provocado por el movimiento debido a la palpación del miembro inyectado se evaluó usando ensayos validados anteriormente. Luger y col., *Cancer Research* 61: 4038 - 4047 (2001); Sabino y col., *International J. of Cancer* 104: 550 - 558 (2003); Sevcik y col., *Pain* 111: 169 - 80 (2004). Los comportamientos de dolor provocados por palpación se examinaron cuando los animales recibieron una palpación normalmente no nociva al tumor- o miembro inyectado tratados de forma simulada durante dos minutos antes de la observación. Luger y col., *Cancer Research* 61: 4038 - 4047 (2001); Sevcik y col., *Pain* 111: 169 - 80 (2004). Los ratones se controlaron durante un periodo de 2 minutos, y se registró el número de estremecimientos y la rigidez del tiempo pasado. Se desarrollaron ensayos de comportamiento provocados por palpación para reflejar la afección clínica cuando los pacientes con experiencia de dolor cáncer de hueso después del movimiento normalmente no nocivo del miembro que tiene tumor.

Después de un periodo de aclimatación de 15 minutos, se midieron la sensibilidad térmica y mecánica en animales no expuestos y no expuestos + anti-NGF para determinar si las respuestas de umbral de dolor normal se alteraron con tratamiento de anti-NGF. La sensibilidad térmica se midió usando un Estimulador de pata térmica (Universidad de California, San Diego, San Diego, CA). Se ajustó la intensidad del calor radiante que manera que los animales no expuestos respondieron al calor mediante la elevación de aproximadamente la pata trasera durante nueve segundos después que se inició el calor. Choi y col., *Life Sci.* 73: 471 - 85 (2003). Se dejó que los ratones se recuperaran durante 5 minutos entre cada prueba. Una única prueba constaba de 4 mediciones por pata trasera la latencia más larga se abandonó y las 3 mediciones remanentes se promediaron. Se midió la sensibilidad mecánica usando un procedimiento validado anteriormente. Chaplan y col., *J. Neuroscience Methods* 53: 55 - 63 (1994) Von Frey filaments (Stoelting CO., Word Dale, IL) se aplicaron a la pata trasera de los animales, y se determinó el umbral de retraimiento aumentando y disminuyendo la intensidad de estímulo entre 0,2 y 15,1 equivalentes gramo de fuerza. Se apreció una respuesta positiva si la pata se retraía rápidamente.

Análisis RT-PCR de los niveles de ARNm de NGF en la línea celular 2472. El ARN total de muestras de tejido de ratón por triplicado de células de sarcoma 2472 se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando el micro kit RNeasy (Qiagen), y se cuantificó el ARN usando el reactivo Ribogreen (Molecular Probes). Se realizó una RT-PCR de dos etapas usando el kit TaqMan Gold RT-PCR (Applied Biosystems). El ARN se transcribió de manera inversa usando hexámeros al azar, y el ADNc se amplificó usando un conjunto cebador/sonda específico para NGF (muNGF-187F: GGGCTGGATGGCATGCT (SEQ ID NO: 3), muNGF-256R: GCGTCCTTGGCAAAACCTI (SEQ ID NO: 4), muNGF-208T: CCAAGCTCACCTCAGTGTCTGGGCC (SEQ ID NO: 5)). Se analizaron las muestras por duplicado a partir del nivel de RT y se normalizaron hasta la entrada de ARN normal.

Análisis estadístico. El paquete de estadísticas de ordenador SPSS versión 11 (SPSS, Chicago, IL) se usó para realizar los análisis estadísticos. Los efectos mixtos de modelación de regresión lineal se usaron para analizar las mediciones repetidas, que pueden acomodar los sujetos medidos a intervalos de tiempo diferentes, incluyen tanto covariados fijos como que varían con el tiempo, y pueden estimar las velocidades de cambio de individuos. Cada variable de resultado dependiente se comparó con todos los grupos usando un análisis no de varianza (Kruskal-Wallis). Se siguieron los análisis significativos de Kruskal-Wallis mediante comparaciones no paramétricas post-hoc entre pares de grupos usando el ensayo de Mann-Whitney U. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a $P < 0,5$. En todos los casos, el investigador está ciego de estatus experimenta de cada animal.

Resultados

La administración de Anti-NGF, no tenía efecto sobre la progresión de la enfermedad o infiltración de macrófagos en el hueso. Los efectos de tratamiento anti-NGF sobre la destrucción de hueso, proliferación de osteoclastos y crecimiento de tumor se examinaron el día 14 después de la inyección de tumor. Los ratones inyectados tratados de forma simulada no mostraron una destrucción de hueso significativa (puntuación de hueso $0,9 \pm 0,4$; Figura 4a), proliferación de osteoclastos ($4,6 \pm 0,4$ osteoclastos/mm) o crecimiento de tumor (Figura 4d), como se establece mediante análisis radiológico, TRAP y H&E/GFP, respectivamente cuando se compara con ratones inyectados con

sarcoma. En los ratones sarcoma + vehículo, existía una destrucción de hueso masiva como se observa y se caracteriza mediante radiolucencia multifocal (puntuación de hueso $3,5 \pm 0,2$; Figura 4b), marcaba un incremento en el número de osteoclastos ($4,0 \pm 0,7$ osteoclastos/mm) y el tumor había llenado completamente el espacio intramedular ($100 \pm 0,0$ % de espacio intramedular; Figura 4e). El tratamiento de ratones que tienen tumor con anti-NGF desde el día 6 al día 14 después de la inyección de tumor no dio como resultado un cambio significativo en la resorción de hueso ($3,1 \pm 0,6$; Figura 4c), sin reducción en la proliferación de osteoclastos inducida por sarcoma ($3,5 \pm 0,1$ de osteoclastos/mm) de crecimiento de tumor ($98,0 \pm 0,9$ % de espacio intramedular; Figura 4f) cuando se compara con animales de sarcoma + vehículo.

Catorce días después de la inyección de tumor, los ratones sarcoma + vehículo mostraron una regulación hacia arriba de los valores de TAM ($39,8 \pm 12,6$ TAM/mm²) cuando se compara con los ratones tratados de forma simulada más vehículo control ($0,0 \pm 0,0$ TAMs/mm²). El tratamiento de anti-NGF de ratones inyectados con sarcoma ($29,5 \pm 7,3$ TAM/mm²) no alteró de manera significativa esta infiltración de TAM, como se observa en los ratones sarcoma + vehículo.

Tratamiento anti-NGF no tenía ningún efecto observable sobre la innervación sensorial o simpática en hueso o piel.

Las fibras nerviosas sensoriales peptidérgicas ligeramente mielinizadas o no mielinizadas se marcaron con un anticuerpo inducido contra el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Las fibras nerviosas CGRP-IR se encontraron a lo largo de todo el hueso entero (periostio, hueso mineralizado y médula ósea) de los animales tanto no expuestos + vehículo ($12,2 \pm 0,3$ fibras/mm) como no expuestos + anti-NGF ($13,0 \pm 0,8$ fibras/mm).

Las fibras nerviosas sensoriales peptidérgicas ligeramente mielinizadas o no mielinizadas (CG RP-I R), las fibras nerviosas grandes mielinizadas (RT97-IR) y Las fibras nerviosas simpáticas noradrenérgicas (TOH-IR) se analizaron en la piel plantar de la pata trasera mediante los anticuerpos inducidos contra CGRP, RT-97 y TOH, respectivamente. No había diferencia significativa entre la intensidad o densidad de fibras positivas CG RP en muestras de sarcoma + vehículo ($12,0 \pm 0,8$ fibras/mm) y sarcoma + anti-NG F ($12,5 \pm 0,6$ fibras/mm) de la piel de la pata trasera (Figuras 5a y 5b). De manera similar, no existía diferencia en intensidad o densidad de fibras positivas CGRP entre ratones no expuestos + vehículo (Figura 5c, n = 8) y no expuestos + anti-NGF (Figura 5d, n = 8). No había ningún cambio en el número de fibras nerviosas que expresan CGRP en ratones inyectados con sarcoma y no expuestos (a, b contra. c, d). Las diferencias en la densidad e intensidad de fibras RT97 positivas y TOH positivas fibras eran también indetectables en animales sarcoma + vehículo ($7,3 \pm 0,7$ RT97+ fibras/mm; $3,1 \pm 0,7$ TOH+ fibras/mm) y sarcoma + tratados con anti-NGF ($7,3 \pm 0,7$ RT97+ fibras/mm; $3,6 \pm 0,7$ TOH+ fibras/mm). De manera similar, no había diferencia significativa entre la intensidad o densidad de fibras CGRP positivas en muestras de la piel de la pata trasera de no expuesto + vehículo ($12,5 \pm 0,5$ fibras/mm) y no expuesto + anti-NGF ($11,9 \pm 0,7$ fibras/mm) (Figuras 5c y 5d). Las diferencias en la densidad e intensidad de fibras RT97 positivas y TOH positivas también fueron indetectables en animales no expuesto + vehículo ($10,4 \pm 0,4$ RT97+ fibras/mm; $3,4 \pm 0,4$ TOH+ fibras/mm) y no expuesto + tratado con anti-NGF ($11,9 \pm 0,7$ RT97+ fibras/mm; $3,0 \pm 0,8$ TOH+ fibras/mm). No había diferencias significativas observables entre la intensidad o densidad de fibras CGRP, RT97 o TOH positivas en las muestras de piel de animales sarcoma+vehículo y sarcoma+anti-NGF contra el no expuesto + vehículo y no expuesto + anti-NGF.

Terapia de anticuerpo anti-NGF redujo de manera significativa los comportamientos de dolor de cáncer de hueso.

Ratones sarcoma + vehículo demostraron una mayor rigidez con el paso del tiempo comparados con los controles tratados de forma simulada más vehículo (Figura 6a). De manera adicional, los ratones sarcoma + vehículo mostraron un número creciente de estremecimientos cuando se compara con los controles tratados de forma simulada más vehículo (Figura 6b). La administración de anti-NGF (desde el día 6 al día 14) en ratones inyectados con sarcoma atenuaba de manera significativa la rigidez espontánea cuando se compara con ratones sarcoma + vehículo (Figura 6a). Tratamiento anti-NGF también redujo de manera significativa el estremecimiento espontáneo en ratones inyectados con sarcoma (Figura 6b).

El dolor provocado por el movimiento se analizó midiendo las respuestas inducidas por palpación. Los ratones sarcoma + vehículo demostraron una mayor rigidez con el paso del tiempo después de palpación cuando se compara con los controles tratados de forma simulada más vehículo (Figura 6c). Los ratones sarcoma + vehículo también mostraron un incremento en el número de estremecimientos después de la palpación cuando se compara con los controles tratados de forma simulada más vehículo (Figura 6d). Tratamiento anti-NGF en ratones inyectados con sarcoma de manera significativa redujo tanto la rigidez provocada por palpación (Figura 6c) como el estremecimiento provocado por palpación (Figura 6d). En estudios preliminares, no se observaron diferencias de comportamiento significativas o efectos secundarios entre los animales operados de forma simulada que recibieron o bien vehículo o anti-NGF.

Figura 6 muestra que el tratamiento anti-NGF (n = 8) desde 6 a 14 días después de la inyección de tumor (triángulo) redujo de manera significativa los comportamientos de dolor continuado y el provocado por palpación los días 10, 12 y 14 cuando se compara con sarcoma + vehículo (n = 8) (cuadrado), y se redujo de manera significativa hasta los niveles de los tratados de forma simulada el día 10 para todos los parámetros (diamante). En todos los momentos, los tratados de forma simulada + vehículo (n = 8) son diferentes de manera significativa de sarcoma + vehículo. De este modo, el tratamiento anti-NGF (10 mg/kg, l. p., cada 5 días) atenuó tanto los comportamientos de dolor de cáncer de hueso continuado como el provocado por el movimiento a lo largo de toda la progresión de la enfermedad.

Tratamiento anti-NGF no tenía efecto sobre los umbrales térmicos o mecánicos iniciales y era comparable con la eficacia de la morfina en la reducción del dolor de cáncer de hueso. No existió incremento significativo en la latencia de la retirada de la pata a un estímulo térmico o incremento en el umbral de la estimulación con la administración de anti-NGF, cuando se compara con los umbrales de dolor normales. El tratamiento anti-NGF no tenía efecto sobre o bien sobre la respuesta térmica normal (Figura 7a) cuando se compara con los no expuestos + vehículo o estimulación mecánica normal (Figura 7b) cuando se compara con los no expuestos + vehículo.

Los animales se ensayaron para comparar la eficacia de sulfato de morfina (MS) con el anticuerpo anti-NGF en la reducción de los comportamientos relacionados con el cáncer de hueso. La determinación del comportamiento los días 10 y 14 revelaron que los animales sarcoma + vehículo mostraron estadísticamente mayor tiempo de rigidez (Figura 7c) y un aumento del tiempo de rigidez en respuesta a la palpación (Figura 7d) del miembro inyectado cuando se compara con los animales tratados de forma simulada más vehículo. El tratamiento con o bien anti-NGF (10 mg/kg/cada 5 días, i. p.) o sulfato de morfina (10 mg/kg, o 30 mg/kg i. p.) redujo de manera significativa tanto los comportamientos de rigidez continuada como la provocada por el movimiento los días 10 y 14 después de la inyección de tumor (Figura 7c, 7d), cuando se compara con los ratones sarcoma + vehículo. El tratamiento con Anti-NGF atenuó de manera significativa los comportamientos de dolor relacionados con cáncer de una manera más eficaz cuando se compara con las dosis de morfina de o bien 10 mg/kg o 30 mg/kg ($P < 0,05$ vs. Sarcoma + anti-NGF).

Tratamiento de Anti-NGF modulo los cambios periféricos inducidos por cáncer de hueso en el DRG. La activación del factor-3 de transcripción (ATF-3), que está en la familia de ATF/CREB, se ha mostrado previamente que se regula hacia arriba en un modelo de lesión de nervio periférico. Tsujino y col., Molecular & Cellular Neurosciences 15: 170 - 82 (2000). Esta regulación hacia arriba se observa en los cuerpos celulares de las neuronas y se sabe que marcan las neuronas lesionadas. No existió un incremento significativo en el porcentaje de neuronas de ATF-3-IR en el ipsilateral L2 DRG al fémur inyectado con sarcoma ($14,0 \pm 5,9\%$ de neuronas totales en ATF-3 expresado en L2; Figura 8a) cuando se compara con los tratados de forma simulada más vehículo ($1,6 \pm 0,5\%$ de las neuronas totales en ATF-3 expresado en L2). El tratamiento con anti-NGF atenuó de manera significativa la expresión de ATF-3 ($2,6 \pm 1,0\%$ de neuronas totales en ATF-3 expresado en L2; Figura 8b) 14 días después de la inyección de tumor.

La infiltración de macrófagos se ha mostrado que está regulada hacia arriba debido al daño de los nervios periféricos. Abbadie y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 7947 - 52 (2003); Myers y col., Exp. Neuro 141: 94 - 101 (1996); Tofaris et al., J. Neurosci. 22: 6696 - 703 (2002). Un anticuerpo inducido contra CD68 (ED-1), una proteína liposómica expresada por macrófagos de tejido activados, se usó para determinar la infiltración de macrófagos en ratones inyectados con sarcoma. Existía una regulación hacia arriba en el número de neuronas de CD68-IR en el DRG ipsilateral de ratones sarcoma + vehículo ($119,6 \pm 12,1$ perfiles celulares/L2 ipsilateral DRG; Figura 8c) comparado con los tratados de forma simulada más vehículo ($80,6 \pm 6,0$ perfiles celulares/L2 ipsilateral DRG). El tratamiento de anti-NGF redujo de manera significativa la regulación hacia arriba de las neuronas CD68-IR en el DRG ipsilateral ($92,0 \pm 9,9$ perfiles celulares /L2 ipsilateral DRG; Figura 8d) en ratones inyectados con sarcoma, que indican una reducción significativa en el número de micrófagos activados y de infiltración dentro de L2 DRG de los animales que tienen tumor.

Tratamiento con anti-NGF modulo los cambios centrales inducidos por cáncer de hueso en la médula espinal. La expresión de dinorfina se ha mostrado que está implicada en el mantenimiento del dolor crónico. Vanderah y col., dolor 92: 5 - 9 (2001). La expresión de dinorfina también se ha mostrado que está regulada hacia abajo en el asta dorsal de la médula espinal en varios estados de dolor persistentes. Ladarola, y col., Brain Res. 455: 205 - 212 (1988); Noguchi y col., (Molecular Brain Research 10: 227 - 233 (1991); Schwei y col., J. Neurosci. 19: 10886 - 97 (1999). En los ratones tratados de forma simulada más vehículo, una pequeña cantidad de neuronas de espinales expresaron dinorfina en las láminas espinales profundas ($2,3 \pm 1,1$ neuronas dyn-IR /L3/L4 sección). Por el contrario, los ratones sarcoma + vehículo expresaron de manera significativa más neuronas dinorfina-IR ($6,0 \pm .0, 5$ neuronas dyn-IR /L3/L4 sección; Figura 9A). El tratamiento Anti-NGF redujo de manera significativa la regulación hacia arriba de la expresión de dinorfina ($2,0 \pm 0,6$ neuronas dyn-IR /L3/L4 sección; Figura 9B) en ratones inyectados con sarcoma.

Se evitó la activación génica temprana inmediata mediante tratamiento con anti-NGF. La expresión de c-Fos en la profundidad del asta dorsal (láminas III-VI) se ha utilizado como un marcador de la sensibilización central en los estados de dolor de cáncer de hueso inducido por sarcoma. Honore y col., Nat. Med. 6: 521 - 8 (2000); Honore y col., Neuroscience 98: 585 - 598 (2000); Luger y col., Cancer Research 61: 4038 - 4047 (2001); Schwei y col., J. Neurosci. 19: 10886 - 97 (1999). La palpación normal, no nociva de los animales operados de forma simulada dio como resultado una expresión mínima de c-Fos en las láminas profundas. Sabino y col., Cancer Res. 62: 7343 - 9 35 (2002). En el estado de cáncer de hueso, los ratones sarcoma + vehículo mostraron un aumento en el número de neuronas c-Fos-IR ($27,7 \pm 4,9$; neuronas cFos-IR /L3/L4 sección; Figura 9C) y el tratamiento con anti-NGF redujo de manera significativa esta expresión ($11,1 \pm 1,9$; neuronas cFos-IR /L3/L4 sección; Figura 9D).

Resultados de RT PCR. Con el fin de ver si las células de tumor de sarcoma eran una posible fuente de NGF, las células 2472 desarrolladas en cultivo se determinaron para determinar su nivel de ARNm de NGF mediante RT-PCR. Estos niveles se compararon con varios tejidos normales del ratón, así como el nivel de ARNm de NGF de la glándula salivar de ratón macho, una fuente de NGF exocrino altamente aberrante. Como se observa en la Tabla 3

más adelante, células sarcoma 2472 in vitro contenían ARNm de NGF fácilmente detectable. Este nivel está en el intervalo de niveles de ARNm de NGF obtenidos a partir de tejidos normales que expresan altos niveles de ARNm de NGF, tal como iris. Shelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos. 81:7951 - 5 (1984). Sin embargo, este nivel tiene varios órdenes de magnitud por debajo del ARNm de NGF presente en la glándula salivar de ratón macho.

Tabla 3 Datos de RT PCR que muestran el nivel de expresión de NGF

Tipo de tejido	Unidades arbitrarias
Cerebro	1,2 ± 0,8
Atria	1,9 ± 0,7
Células 2472	8 ± 1,1
Iris	8,8 ± 3,6
Glándula submaxilar	1359,1 ± 583,7

Ejemplo 3

Efecto de anticuerpo monoclonal anti-NGF en el tratamiento del dolor de cáncer de hueso en un modelo murino desarrollado mediante inyección intramedular de células de tumor de próstata osteoblásticas en el fémur

Procedimientos

Modelo de próstata de tipo murino de dolor de cáncer de hueso. Se usó un modelo de próstata de tipo murino de dolor de cáncer de hueso para determinar la eficacia de tratamiento con anticuerpo anti-NGF 911 (un anticuerpo monoclonal de ratón; véase Hongo, y col., Hibridoma 19: 215 - 227 (2000)). Células de carcinoma canino osteoblástico (ACE-1, regalo del Dr. Thomas J. Rosol, Ohio State Univeristy) se mantuvieron y se realizaron las inyecciones de tumor células como se ha descrito previamente. Sabino y col., Cancer Res. 62: 7343 - 7349,2002; Honore y col., Nature Medicine 6: 521 - 528, 2000; Honore y col., Prog. Brain Res. 129: 389 - 397, 2000; Luger y col., Cancer Research 61: 4038 - 4047, 2001. En resumen, se desarrollaron células ACE-1 en medio a 37° C y 5% de CO₂. Las células se desarrollaron en matraces T75 (7,5 cm²) y se pasaron a 80 - 90% de confluencia, dos veces por semana. Solamente los pasajes entre 3 y 11 se usaron en este estudio. El día 0, después de la inducción de la anestesia general con pentobarbital de sodio (50 mg/kg, i.p.), se realizó una artrotomía exponiendo los cóndilos del fémur distal. Solución salina estéril tamponada de Hank (HBSS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; 20 µl; de forma simulada, n = 7) o media que contenía 10⁵ células ACE-1 caninas osteoblásticas (20 µl, ACE-1, n = 60) se inyectó en el espacio intramedular del fémur de ratón y el sitio de inyección se selló con amalgama dental (Dentsply, Milford, DE), seguido de irrigación con agua filtrada estéril. Los experimentos se realizaron sobre un total de 89 machos adultos desnudos atímicos de 8 - 10 semanas de edad (Harlan Laboratories, Madison, WI), que pesaban 20 - 32 g. Se alojaron los ratones de acuerdo con las directrices de los Institutos Nacionales de Salud en condiciones específicas sin patógenos (SPF) en jaulas autoclavadas mantenidas a 22°C con un ciclo de luz y oscuridad alternativamente de 12 horas y se les proporcionó alimento y agua autoclavados *ad libitum*.

Se usó un punto final el día 19 después de la inyección, en este momento es cuando el tumor está todavía confinado el tumor en el hueso, existe una presentación máxima de comportamientos de dolor relacionados con el cáncer y renovación de hueso inducida por tumor. Se usaron animales tratados de forma simulada para análisis de control de experimentos de comportamiento e histología/inmunohistoquímica de hueso, ya que los animales no expuestos no eran de manera significativa diferentes de los tratados de forma simulada en comportamiento 9 días después de la inyección del tumor.

Tratamiento con anticuerpo anti-NGF o morfina. Los días 7, 12, y 17 después de la inyección de tumor, los animales inyectados con ACE-1 se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) con anticuerpo anti-NGF 911 a 10 mg/kg (ACE-1 + anti-NGF, n = 9); los animales inyectados con ACE-1 se inyectaron (i.p.) con solución salina (ACE-1 + veh, n = 21; 1.4 µl/kg); y los animales inyectados de forma simulada se inyectaron por vía (i.p.) con solución salina (de forma simulada + veh, n = 7). Todos los animales se analizaron en comportamiento entre los días 7 y 19.

Para la comparación de comportamiento de anticuerpo anti-NGF con sulfato de morfina, se les proporcionó a los ratones una dosis aguda de morfina 15 minutos antes del ensayo de comportamiento (no expuestos: n = 6; de forma simulada: n = 7; ACE-1 + vehículo: n = 7; ACE-1 + anti-NGF: n = 7; ACE-1 + morfina 10 mg/kg, s. c.: n = 8; ACE-1 + morfina 30 mg/kg, s. c.: n = 8). Para el ensayo de sensibilidad térmica y mecánica y la valoración de la inervación de la piel de la pata trasera, los ratones no expuestos se dividieron en dos grupos de tratamiento que reciben o bien solución salina estéril (no expuesto + vehículo: n = 8) o anticuerpo anti-NGF (no expuestos + anti-NGF: n=8, 10 mg/kg, i.p.).

Análisis de comportamiento. Se ensayaron los animales para comportamientos relacionados con el dolor tanto antes como el día 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 después del implante de tumor o de inyección de forma simulada. Los animales se ensayaron para comportamiento usando los siguientes ensayos: dolor continuado (rigidez espontánea y estremecimiento) y el dolor provocado por el movimiento (rigidez provocada por palpación y estremecimiento provocado por palpación). Los animales se colocaron en una caja de observación de plástico transparente con un suelo de malla de alambre y se dejó que se habituaran durante un período de 30 min. Después de la aclimatación, se determinaron la rigidez espontánea y estremecimiento espontáneo. La rigidez y estremecimiento inducido por palpación se determinaron después del período de 2 min de la palpación no nociva normalmente del fémur distal en animales inyectados con ACE-1 y de forma simulada. Estos ensayos se realizaron como se describe en los ejemplos 1 y 2.

Eutanasia y procesamiento de tejido. Se sacrificaron los ratones 19 días después de la inyección del tumor y se procesaron los tejidos para análisis inmunohistoquímico de la femoral y la piel de la pata trasera como se ha descrito previamente. Honore y col., Prog. Brain Res. 129: 389 - 397, 2000; Honore y col., Nat. Med. 6: 521 - 8 (2000); Luger y col., Cancer Research 61: 4038 - 4047 (2001). Se sacrificaron los ratones con CO₂ y se perfundieron por vía intracardiaca con 12 ml de solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS) seguido de 25 ml de solución de 4% de formaldehído/12,5% de ácido pícrico.

Se retiró la piel plantar de la pata trasera, se fijó después en el fijativo de perfusión, y se crioprotegió por congelación con 30% de sacarosa durante 24 horas. Se cortaron secciones de la piel en serie, 60 µm de espesor sobre un microtomo de deslizamiento, se recogieron en PBS y se procesaron como secciones flotantes libres. Después de seccionar, las secciones de la piel plantar se enjuagaron brevemente en PBS y después se incubaron en solución de bloqueo (3% de suero de burro normal (NOS) 0,3% de Triton X-1 00 en PBS) durante 1 hr seguido de incubación durante toda una noche en el anticuerpo primario. Las secciones de piel se inmunotifieron para el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (1 :15.000; Sigma, St. Louis, MO), tirosina hidroxilasa (TOH) (anti-TOH de conejo policlonal, 1:2.000, Chemicon, Temecula, CA) y neurofilamento H (Clon RT97) (anti=RT-97 de conejo policlonal, 1:2.500, Chemicon, Temecula, CA).

Después de la incubación en anticuerpo primario, las secciones se enjuagaron en PBS y después se incubaron en la solución del anticuerpo secundario durante 3 hr. Anticuerpos secundarios, conjugados a Cy3 o biotina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), se usaron a 1:600 ó 1:500 respectivamente. Para detectar los anticuerpos secundarios conjugados a biotina: las secciones se enjuagaron en PBS y se incubaron en estreptavidina conjugada a Cy3 (1 :4000; Jackson ImmunoResearch) durante 45 minutos. Para confirmar la especificidad de los anticuerpos primarios, los controles incluían la omisión del anticuerpo primario o preabsorción con el péptido sintético correspondiente. Después de los procedimientos de inmunotinción, se enjuagaron secciones de piel plantar, se montaron sobre portaobjetos recubiertos de gelatina. Las secciones montadas después se deshidrataron en gradientes de alcohol (70, 90, 100%), se limpiaron en xileno y se montaron los cubreobjetos con DPX (Fluka, Buchs, Suiza).

Después del examen radiológico, el día 19 después de la inyección del tumor, la femoral derecha (control interno) e izquierda (que tienen tumor) se fijaron en ácido pícrico y 4% de formalina a 4°C durante toda una noche y se descalcificaron en 10% de EDTA (Sigma) durante no más de 14 días. Después los huesos se incrustaron en parafina. Las secciones femorales, 5 µm de espesor se cortaron en el plano lateral y se tificaron con fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y hematoxilina y eosina (H y E) para visualizar las características histológicas de la médula ósea normal, tumor, osteoclastos, osteoblastos, y macrófagos (Ms).

El análisis inmunohistoquímico de la femoral tratada de forma simulada y femoral cancerosa se realizó sobre secciones en serie descalcificada, incrustadas en parafina de 14 µm. Se inactivaron las peroxidasas endógenas mediante incubación de las secciones en 2% de peróxido de hidrógeno durante 1 hora. Después las secciones se enjuagaron tres veces con PBS durante 10 minutos y se bloquearon en tampón de bloqueo TSA (Sistema TSA-Más Cianina 3, PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, MA) durante 1 hora. Se añadió antisuero primario tras la retirada del tampón de bloqueo y se dejó incubar a temperatura ambiente durante toda una noche. Las fibras nerviosas sensoriales aferentes primarias no mielinizadas y ligeramente mielinizadas se marcaron usando un anticuerpo inducido contra péptido relacionado con el gen anti-calcitonina (CGRP) de conejo policlonal (1: 15.000; Sigma). Las secciones se enjuagaron tres veces en tampón de lavado TSA durante 10 minutos seguido de incubación durante 45 minutos en estreptavidina HRP (1:4.000). Después las secciones se enjuagaron tres veces con tampón de lavado TSA durante 10 minutos. Tiramina conjugada a CY3 (1:600) del sistema TSA-Más Cianina 3 se aplicó a la femoral durante 7 minutos, se enjuagó dos veces con tampón de lavado TSA y una vez con PBS. Finalmente, las secciones se secaron al aire, se deshidrataron a través de un gradiente de alcohol (70, 90 y 100%), se limpiaron en xileno y se montaron con DPX (Fluka).

Análisis radiográfico de huesos. Se obtuvieron radiografías (Faxitron X-ray Corp., Wheeling, IL) de la femoral diseccionada en el día 19 momento para determinar el grado de formación y destrucción ósea. Se capturaron las imágenes sobre película de mamografía Kodak Min-R 2000 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY; tiempos de exposición: 7 seg, 21 kVp). El análisis de la densidad ósea se usó para determinar el grado de renovación de hueso inducida por tumor de manera radiográfica en el plano lateral de las imágenes de hueso enteras a 5X de ampliación. La femoral que tiene tumor y que no tienen tumor (n = 8 para no expuesto + vehículo, de forma simulada + vehículo,

ACE-1+ vehículo, y ACE-1 + anti-NGF) se analizaron usando 'ImageJ (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD)' de una manera similar a un protocolo descrito previamente. Corey y col., Prostate 52: 20 - 33, 2002. En resumen, películas de radiografía en blanco y un comprimido de etapa estándar (Eastman Kodak Co.) se usaron para desarrollar una curva de calibración. ImageJ se usó para medir la densidad óptica y posteriormente se convirtió en transmisión como sigue: $\text{transmisión} = 1/(\text{antilog}_{10}[\text{densidad óptica}])$. Los datos dados se determinan a partir de una imagen negativa, de este modo la transmisión es una representación directa de la densidad ósea. Se usó un escáner HP ScanJet 7400c para capturar las radiografías de la femoral de subsaturación y se registraron las lecturas por duplicado de cada fémur. Los resultados se presentan como media de transmisión normalizada $\pm$ E.

Análisis histológico de osteoblastos, osteoclastos, y macrófagos, crecimiento de tumor y remodelación ósea. Se analizó la proliferación de osteoblastos mediante cuantificación del número de osteoblastos inmediatamente en contacto con las regiones tanto de nueva formación ósea inducida por tumor contenida dentro del fémur como el hueso cortical a lo largo de todo el espacio intramedular intradiafisial para animales no expuestos, inyectados de forma simulada, y ratones que tienen tumor. El espacio intramedular intradiafisial se definió como la extensión desde las trabéculas distales proximales a las trabéculas proximales distales y se seleccionó para cuantificación a medida que se produce la remodelación del hueso activo predominante en esta región. Los osteoblastos se identificaron como las células en contacto directo con la matriz ósea de avance nuevo y dispuesta en la capa epitelial cuboidal típica o columnar y conectada a otra mediante un proceso ligero identificable a alta ampliación (200x o mayor). Los resultados se presentan como el número de osteoblastos/mm² de espacio diafisial intramedular para los ratones no expuestos, inyectados de forma simulada, y que tienen tumor. Se determinó la proliferación de osteoclastos mediante cuantificación del número de TRAP+ osteoclastos en la interfase hueso/tumor y en la interfase médula normal/hueso para los ratones no expuestos, inyectados de forma simulada, e inyectados con ACE-1 —sobre las secciones femorales teñidas con TRAP como se ha descrito previamente. Honore y col., Nat. Med. 6: 521 - 528 (2000). En resumen, los osteoclastos son células histológicamente diferenciadas que aparecen con TRAP+ y que están estrechamente asociados a regiones de resorción ósea. Estas células son multinucleadas y se encuentran en las lagunas de Howship junto con el hueso cortical y trabecular. Fawcett, D. W.; A Textbook of Histology. In: D. Dreibelbis (ed.), Bone, 11^a edición, p. 211 - 213. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 1986. La proliferación de macrófagos (Ms) se determinó mediante la cuantificación de células TRAP+ que estaban dispersas a lo largo del tumor y médula normal no asociadas a la superficie endostial del hueso mineralizado. Los macrófagos dentro del hueso se llegan a activar debido a los factores liberados del tumor que estimulan las células, y la aparición celular de estos Ms activados se marca por su superficie altamente irregular, lamelipodia múltiple y vacuolas fagocíticas. Los resultados se expresan como el número medio de osteoclastos por mm² o Ms por mm² de espacio diafisial intramedular, respectivamente.

La femoral que contiene células ACE-1 se representaron en imagen usando microscopía de campo brillante sobre una microscopía de fluorescencia Nikon E600 equipado con una cámara digital SPOT II utilizando el software de captura de imágenes SPOT (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI). El área total del espacio intramedular y el porcentaje de espacio intramedular ocupado por tumor, formación ósea, y células hematopoyéticas remanentes se calculó usando el software Image Pro Plus v3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Sabino y col., Cancer Res. 62: 7343 - 7349, 2002; Sevcik y col., Pain 111: 169 - 180, 2004. La formación ósea se analizó usando las mismas secciones femorales teñidas con H y E usadas para cuantificar el crecimiento de tumor. Las secciones del fémur se vieron en luz polarizada para identificar las regiones de formación ósea tejida y lamelar. Las regiones de formación ósea tejida se representan en imágenes con la cámara digital SPOTII y se cuantificaron usando el software Image Pro Plus v3.0. Los resultados se presentan como área de tumor, formación ósea inducida por tumor, y células hematopoyéticas remanentes como un porcentaje de área intramedular total.

Cuantificación de fibras sensoriales en hueso y piel. El número de fibras nerviosas sensoriales se determinó como se ha descrito previamente. Mach y col., Neuroscience 113: 155 - 166, 2002. En resumen, el número de fibras CGRP-IR en tres regiones óseas (proximal, distal y diafisial) y los tres tejidos óseos (periostio, hueso mineralizado y médula) se identificaron usando el sistema de formación de imágenes confocales MRC-1 024 (Bio-Rad, Richmond, CA) equipado con un objetivo 20 X. Los recuentos de las fibras nerviosas se realizaron mediante observando seis secciones de fémur por ratón con un microscopio equipado con fluorescencia Olympus BH-2. Solamente las fibras nerviosas mayores que 30 μ m se incubaron en el análisis. Para medir el área de la superficie total (mm²) de cada hueso, los investigadores analizaron las mismas secciones de fémur de las que se obtuvieron los recuentos de fibras nerviosas. El área de hueso total se midió sobre imágenes digitales de las secciones de fémur adquiridas usando la cámara digital SPOTII y software Image Pro Plus v.3.0. Los resultados se presentan como el número de fibras contadas por área ósea total.

La cuantificación de densidad de inervación epidérmica se realizó sobre 4 secciones de piel de la pata trasera plantares seleccionadas al azar por ratón. El número total de fibras nerviosas CGRP, TOH y RT97-IR se contó a 200 X de aumento. Las reglas de recuento se establecieron para contar solamente las fibras intraepidérmicas y no ramas múltiples de la misma fibra. McCarthy y col., Neurology 45: 1848 - 1855, 1995. La longitud total de epidermis en todas las secciones cuantificadas se midieron usando una cuadrícula de ocular de 1 cm². Solamente las fibras nerviosas que eran al menos 30 μ m de longitud, y proyectadas en la epidermis se contaron. Los resultados se proporcionan como el número medio de fibras nerviosas epidérmicas por mm de longitud por ratón.

Análisis RC PCR de los niveles de ARNm de NGF en células ACE-1. ARN total de células ACE-1 tumorales de cerebro de perro o de próstata de perro se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando el microkit RNeasy (Qiagen), y el ARN se cuantificó usando el reactivo Ribogreen reagent (Molecular Probes). Se realizó RT-PCR de dos fases usando el kit TaqMan Gold RT-PCR (Applied Biosystems). El ARN se transcribió de manera inversa usando hexámeros, y el ADNc se amplificó usando un conjunto de cebador/sonda específica para NGF (LB041: AACAGGACTCACAGGAGCAA (SEO ID NO:6), LB042: CGGCACTTGGTCTCAAAGAA (SEO ID NO:7), y LB045: AATGTICACCTCTCCAGCACCATCA (SEO ID NO:8)). Las muestras se analizaron por duplicado a partir de la etapa de RT y se normalizan para la entrada de ARN total.

Análisis estadístico. Se usó el paquete de estadística de ordenador Statview (SAS Institute, Inc., Cary, NC) para realizar los ensayos estadísticos. Se usó un ANOVA de una vía para comparar los resultados de comportamiento, los resultados histológicos óseos, y mediciones, inmunohistoquímicas entre los grupos experimentales. Para comparaciones múltiples, se usó el ensayo Fishers PLSD (diferencia significativa menos protegida) post hoc. El nivel de significación se estableció a $P < 0,05$. El investigador individual responsable del análisis de comportamiento, inmunohistoquímico y puntuación de la remodelación de hueso era ciego para la situación experimental de cada animal.

Resultados

La terapia de Anti-NGF atenuaba el dolor de cáncer de hueso hasta un grado mayor que el sulfato de morfina pero no afectaba a los umbrales térmicos o mecánicos iniciales. El dolor continuado se analizó midiendo la rigidez espontánea y estremecimiento durante un período de tiempo de 2 minutos. Los ratones ACE-1 + vehículo demostraron un mayor tiempo de rigidez con el paso del tiempo ($7,7 \pm 0,8$ seg, día 19) cuando se compara con los controles tratados de forma simulada más vehículo ($0,6 \pm 0,3$ seg, día 19, Figura 10A). De manera adicional, los ratones ACE-1 + vehículo mostraron un número incrementado de estremecimientos ($11,9 \pm 1,2$, día 19) cuando se compara con los controles tratados de forma simulada más vehículo ($1,0 \pm 0,4$, día 19, Figura 10B). Administración de anti-NGF en ratones inyectados con ACE-1- de manera significativa atenuaban la rigidez espontánea ($1,2 \pm 0,4$ seg, día 19) cuando se compara con los ratones ACE-1 + vehículo (Figura 10A). Tratamiento anti-NGF también redujo de manera significativa el estremecimiento espontáneo en ratones infectados con ACE-1 ($2,1 \pm 0,7$, día 19) cuando se compara con ACE-1 + vehículo (Figura 10B). En los estudios preliminares, no se observaron diferencias de comportamientos significativas o efectos secundarios entre los controles operados de forma simulada que reciben o bien vehículo o anti-NGF.

La terapia de Anti-NGF no tenía efecto sobre o bien la respuesta térmica normal ($10,2 \pm 0,4$ seg, día 19) cuando se compara con no expuesto + vehículo ($11,2 \pm 0,4$ seg, día 19, Figura 10C) o respuesta mecánica normal ($5,4 \pm 0,3$ g, día 19) cuando se compara con no expuesto + vehículo ($5,2 \pm 0,4$ g, día 19, Figura 10D).

Los animales se ensayaron para comparar la eficacia de sulfato de morfina (MS) al anticuerpo anti-NGF en la reducción de comportamientos relacionados con cáncer de hueso. La evaluación del comportamiento los días 11 y 19 después de la inyección del tumor revelaron que los animales ACE-1 + vehículo mostraron estadísticamente un tiempo de rigidez más largo del miembro inyectado ($6,0 \pm 1,0$ y $7,6 \pm 1,2$ seg, día 11 y 19, respectivamente) comparado con los ratones tratados de forma simulada más vehículo ($0,4 \pm 0,2$ y $0,6 \pm 0,3$ seg, día 11 y 19, respectivamente, Figura 10E). ACE-1 + vehículo también mostró un número significativamente mayor de estremecimientos del miembro inyectado ($8,6 \pm 1,2$ y $11,7 \pm 1,7$, día 11 y 19, respectivamente) comparado con los ratones tratados de forma simulada más vehículo ($0,7 \pm 0,3$ y $1,0 \pm 0,4$, día 11 y 19, respectivamente, Figura 10F). La rigidez continuada se redujo de manera significativa mediante o bien tratamiento crónico de anti-NGF ($2,1 \pm 1,1$ y $1,4 \pm 0,4$ seg, día 11 y 19, respectivamente), agudo 10 mg/kg de sulfato de morfina ($3,5 \pm 0,3$ y $4,0 \pm 0,5$ seg, día 11 y 19, respectivamente) o agudo 30 mg/kg de sulfato de morfina ($2,2 \pm 0,3$ y $2,0 \pm 0,4$ seg, día 11 y 19, respectivamente), cuando se compara con ratones ACE-1 + vehículo (Figura 10E). El estremecimiento continuado también se redujo de manera significativa mediante o bien tratamiento crónico de anti-NGF ($3,4 \pm 1,7$ y $2,6 \pm 0,6$, día 11 y 19, respectivamente), agudo 10 mg/kg de sulfato de morfina ($5,6 \pm 0,5$ y $6,8 \pm 0,7$, día 11 y 19, respectivamente) o agudo 30 mg/kg de sulfato de morfina ($3,6 \pm 0,5$ y $3,5 \pm 0,7$, día 11 y 19, respectivamente), cuando se compara con ratones ACE-1 + vehículo (Figura 10F). La terapia de anti-NGF atenuaba de manera significativa los comportamientos de dolor relacionados con cáncer de hueso más eficazmente que agudo 10 mg/kg de sulfato de morfina. No se observaron diferencias en los pesos terminales entre animales tratados de forma simulada + vehículo (27 ± 1 g), ACE-1 + vehículo (27 ± 1 g), y ACE-1 + Anti-NGF (26 ± 1 g). En estos estudios, no se observaron diferencias significativas de comportamientos o efectos secundarios, tales como ataxia, enfermedad, o letargia, entre animales que recibían o bien vehículo o anti-NGF.

La terapia de Anti-NGF atenuaba el dolor de cáncer de hueso provocado por tocamiento. También se determinó el comportamiento del dolor provocado por tocamiento. La rigidez y estremecimiento inducido por palpación se midieron después del período de 2 min de palpación normalmente nociva del fémur distal en animales ACE-1 e inyectados de forma simulada. Como se muestra en la Figura 10G y 10H, los animales inyectados con ACE-1 (administrados con solución salina) desarrollaron comportamientos de dolor provocado por tocamiento el día 7 como se determina mediante rigidez inducida por palpación (Fig. 10G) y estremecimiento inducido por palpación (Fig. 10H) (ambos $p < 0,01$, ANOVA) cuando se compara con los animales inyectados de forma simulada (administrados con solución salina). Figura 10G y 10H también muestra que la administración i. p. de anticuerpo anti-NGF 911 de

manera significativa redujo la rigidez inducida por palpación (Fig. 10G) y estremecimiento inducido por palpación (Fig. 10H) en ratones inyectados con ACE-1 desde el día 11 al día 19 después del implante de tumor ACE-1 cuando se compara con la administración de solución salina a ratones inyectados con ACE-1 - ($p < 0,01$, ANOVA, para tanto la rigidez inducida por palpación como el estremecimiento inducido por palpación). Estos resultados indican que el anticuerpo 911 anti-NGF reduce el dolor provocado por tocamiento en ratones inyectados con ACE-1.

La terapia de Anti-NGF no tenía efecto sobre los marcadores de la progresión de enfermedad o formación ósea inducida por tumor. Los efectos de la terapia de anti-NGF sobre la formación y destrucción ósea, crecimiento de tumor (Figura 11), y proliferación de osteoclastos (Figura 12) se examinaron 19 días después de la inyección del tumor (Tabla 4 más adelante). Los ratones inyectados de forma simulada no demostraron remodelación ósea significativa (valor de transmisión normalizado $115 \pm 2\%$) (Figura 11 A), proliferación de osteoclastos a lo largo del espacio intramedular entero (16 ± 10 osteoclastos/mm² de área intramedular diafisial) (Figura 12A) o células tumorales ($0 \pm 0\%$) (Figura 110), como se determina mediante análisis radiológico, TRAP y H y E, respectivamente, cuando se compara con ratones inyectados con ACE-1. En ratones ACE-1 + vehículo, era amplio, pero casi equivalente a la formación y destrucción ósea como se observa y se caracteriza mediante unión por puentes diafisial multifocal y radiolucencias (valor de transmisión normal de $109 \pm 5\%$) (Figura 11 B), incremento notable en el número de osteoclastos (Figura 12B) y osteoblastos a lo largo del área diafisial intramedular (47 ± 3 osteoclastos/mm² y 127 ± 7 osteoblastos/mm²) y el tumor ha llenado la mayoría del espacio intramedular ($60 \pm 7\%$ de espacio intramedular) (Figura 11 E). Tratamiento de ratones que tienen tumor con anticuerpo antiNGF desde el día 7 después de la inyección de tumor no dio como resultado un cambio significativo en la remodelación ósea (valor de transmisión normalizado de $106 \pm 9\%$) (Figura 11 C), sin reducción en la proliferación de osteoclastos inducida por ACE-1 (Figura 12C) u osteoblastos a lo largo del área diafisial intramedular (47 ± 5 osteoclastos/mm² y 118 ± 15 osteoblastos/mm²) o desarrollo de tumor ($57 \pm 6\%$ de espacio intramedular) cuando se compara con animales ACE-1 + vehículo (Figura 11 F).

Tabla 4: cuantificación Histológica y Radiológica de remodelación ósea y progresión de tumor en animales ACE-1 tratados con Anti-NGF y con vehículo

	No expuestos + vehículo	Simulado + vehículo	ACE-1 + vehículo	ACE-1 + anti- NGF
1. Histomorfometría ósea				
Osteoclastos (OC n°/mm ² espacio diafisial intramedular)	7 ± 1	16 ± 10	$47 \pm 3^{a,b}$	$47 \pm 5^{a,b}$
Osteoblastos (OC n°/mm ² espacio diafisial intramedular)	81 ± 4	72 ± 5	$127 \pm 7^{a,b}$	$118 \pm 15^{a,b}$
Macrófagos (Ms) (Ms/mm ² espacio diafisial intramedular)	2 ± 1	2 ± 1	$27 \pm 2^{a,b}$	$24 \pm 3^{a,b}$
Nueva formación ósea inducida por tumor (% de espacio diafisial intramedular ocupado)	0 ± 0	0 ± 0	$14 \pm 2^{a,b}$	$13 \pm 1^{a,b}$
Células tumorales (% de espacio diafisial intramedular ocupado)	0 ± 0	0 ± 0	$60 \pm 7^{a,b}$	$57 \pm 6^{a,b}$
Células hematopoyéticas (% de espacio diafisial intramedular ocupado)	100 ± 0	100 ± 0	$26 \pm 8^{a,b}$	$30 \pm 6^{a,b}$
2. Puntuación de remodelación ósea radiológica				
% de Transmisión normalizada (1/(antilog[Densidad óptica]) ----- X 100% (Transmisión no expuesto)	100 ± 2	115 ± 2	109 ± 5	106 ± 9
^a $P < 0,05$ contra no expuesto				
^b $P < 0,05$ contra simulado				

Diecinueve días después de la inyección de tumor, los ratones ACE-1 + vehículo mostraron un incremento en los macrófagos (Ms) (27 ± 2 Ms/mm² área diafisial intramedular) cuando se compara con los ratones control tratados de forma simulada más vehículo (2 ± 1 Ms/mm²). El tratamiento Anti-NGF de ratones inyectados con ACE-1 (24 ± 3 Ms/mm²) no alteraba de manera significativa la infiltración de Ms, como se observa en los ratones ACE-1 + vehículo (Tabla 4).

La terapia Anti-NGF no tenía efecto observable sobre la inervación sensorial o simpática en hueso o piel. Las fibras nerviosas sensoriales peptidérgicas escasamente mielinizadas o no mielinizadas (CGRP-IR), las fibras sensoriales mielinizadas grandes (RT97-IR) y las fibras nerviosas simpáticas noradrenérgicas (TOH-IR) se analizaron en la femoral infectada con ACE-1 o la piel plantar de la pata trasera mediante inmunohistoquímica usando anticuerpos inducida contra CGRP, RT-97 y TOH, respectivamente. Las fibras nerviosas CGRP-IR se encontraron a lo largo del hueso entero (periostio, hueso mineralizado. Médula ósea y tumor) de animales ACE-1 + vehículo ($23,5 \pm 1,9$ fibras/mm²) y ACE-1 + anti-NGF ($24,0 \pm 1,9$ fibras/mm²) así como en los tratados de forma simulada + vehículo

(28,2 ± 1,5 fibras/mm²) y los animales no expuestos + vehículo (24,6 ± 2,4 fibras/mm²) o animales no expuestos + anti-NGF (23,1 ± 1,9 fibras/mm²) (Figura 14). No existía diferencia significativa entre la intensidad o densidad de fibras CGRP-IR en las muestras de piel de la pata trasera de ACE1 + vehículo (13,9 ± 0,5 fibras/mm) y ACE-1 + anti-NGF (15,2 ± 0,7 fibras/mm) (Figura 13A y B). De manera similar, no existía diferencia significativa entre la intensidad o densidad de fibras CGRP-IR en las muestras de piel de la pata trasera de no expuestos + vehículo (14,4 ± 0,4 fibras/mm) y no expuestos + anti-NGF (14,2 ± 1,3 fibras/mm) (Figura 14A y B). Las diferencias en la densidad e intensidad de fibras RT97-IR y TOH-IR eran también indetectables en los animales no expuestos + vehículo (4,2 ± 2,2 RT97 + fibras/mm; 16,0 ± 2,7 TOH + fibras/mm) y no expuestos + tratados con anti-NGF (8,0 ± 0,6 RT97 + fibras/mm; 12,8 ± 1,1 TOH + fibras/mm). No existían diferencias significativas observable entre la intensidad o densidad de fibras CGRP, RT97 o TOH-IR en las muestras de piel de animales ACE-1 + vehículo y ACE-1 + anti-NGF contra los no expuestos + vehículo y no expuesto + anti-NGF.

Nivel de expresión de ARNm en células ACE-1. Se comparó la expresión de NGF en células de cerebro de perro y ACE-1. Se analizaron cinco muestras independientes de ACE-1, y en cada una la expresión de NGF estaba por debajo del nivel de detección del ensayo de PCR. NGF en cerebro de perro cruzó el umbral en el ciclo 35,2 de un experimento de 40 ciclos, mientras que las muestras de ACE-1 no cruzaban el umbral después de 40 ciclos. De este modo, la expresión de ARNm de NGF en las muestras ACE-1 era al menos 27,8 veces menos que la expresión en el cerebro.

Ejemplo 4

Efectos analgésicos de anticuerpo anti-NGF E3 en pacientes con dolor moderado a grave de metástasis para el hueso debido a cáncer o bien de próstata o de mama

En un estudio al azar, controlado por placebo, doble ciego, los efectos analgésicos (incluyendo tiempo de aparición, tiempo hasta el máximo, duración así como alivio del dolor se midió mediante escala análoga Visual (VAS)) de dosis intravenosas dosis (100 µg/kg, 300 µg/kg, o 1,000 µg/Kg) de anticuerpo E3 anti-NGF se comparan con placebo en pacientes con dolor moderado a grave de metástasis al hueso debido a cáncer o bien de próstata o de mama. Varones y hembras adultos (edades entre 35 y 75) que están experimentando dolor moderado a grave de metástasis al hueso debido a cáncer o bien de próstata o de mama, se enrolaron en el estudio. Durante el período de selección, se requiere a los pacientes registrar su nivel de dolor cuatro veces al día and y también registraron su uso de otra medicación analgésica durante 14 días antes de la administración de anticuerpo E3 anti-NGF.

Doscientos ochenta pacientes se admiten para el estudio. La administración de anticuerpo anti-NGF E3 se produce en las mañanas del día 1 y el día 29, después del registro de dos semanas del nivel de dolor inicial, uso de otros analgésicos, y episodios adversos. Doscientos ochenta pacientes se dividen en cuatro grandes grupos y cada grupo tiene setenta pacientes. Los pacientes en cada grupo se tratan con placebo, 100 µg/kg, 300 µg/kg, o 1,000 µg/kg de anticuerpo anti-NGF E3.

Los efectos analgésicos se evaluaron cuatro veces al día durante catorce días antes de la dosificación y durante un período de seis meses después de la administración of anticuerpo E3. El resultado se evalúa como el cambio de la selección de estado inicial (nivel medio de dolor durante catorce días antes de la administración de placebo o anticuerpo E3). Cualquier disminución en las puntuaciones de dolor y / o disminución en el uso de otros analgésicos en uno o más grupos de pacientes tratados con anticuerpo E3 anti-NGF comparado con placebo demuestran la eficacia de tratamiento con anticuerpo anti-NGF E3.

Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para los fines de claridad de entendimiento, las descripciones y los ejemplos no deben construirse limitando el ámbito de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Rinat Neuroscience Corp.
Regents of university of Minnesota

<120> Procedimientos de tratamiento del dolor de cáncer de hueso mediante la administración de un antagonista del factor de crecimiento neuronal

<130> PC19494A

<150> US 60/560.781

<151> 2004-04-07

<150> US 60/620.654

<151> 2004-10-19

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

ES 2 665 758 T3

<210> 1
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Construcción sintética
<400> 1

```

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

```

10 <210> 2
<211> 109
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética
<400> 2

```

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

```

ES 2 665 758 T3

20

25

30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 3
<211> 17
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 3
gggctggatg gcatgct 17

10

<210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

15

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 4
gcgtccttgg caaacctt 19

20

<210> 5
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Construcción sintética

25

<400> 5
ccaagctcac ctcaagtgtct gggcc 25

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

30

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 6
aacaggactc acaggagcaa 20

35

<210> 7
<211> 20

	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
5	<400> 7	
	cggcacttg tctcaaagaa	20
	<210> 8	
	<211> 26	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 8	
	aatgttcacc tctcccagca ccatca	26
15		

REIVINDICACIONES

1. Uso de un antagonista del factor de crecimiento neuronal (NGF) en la fabricación de un medicamento para tratar dolor de cáncer de hueso moderado a severo en un individuo, en el que el antagonista del NGF es un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión del NGF humano a trkA y/o p75; y en el que el dolor de cáncer de hueso es de cáncer asociado a metástasis de hueso con actividad osteoblástica.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo compite por la unión al NGF humano con el anticuerpo MAb 911 o un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y 2.
3. El uso de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo del NGF humano que el anticuerpo MAb 911 o un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y 2.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo se une a un epítipo del NGF que comprende uno o más de: restos K32, K34 y E35 del NGF humano; restos Y79 y T81 del NGF humano; restos H84 y K88 del NGF humano; resto R103 del NGF humano; resto E11 del NGF humano; resto Y52 del NGF humano; restos L112 y S113 del NGF humano; restos R59 y R69 del NGF humano; o los restos V18, V20 y G23 del NGF humano.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo comprende todas las CDR del anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2.
6. El uso de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2.
7. El uso de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo comprende una región constante de IgG2a de cadena pesada humana que contiene la mutación A330P331 a S330S331, numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2a de tipo silvestre.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo antagonista anti-NGF se une al NGF humano con un valor de K_D de aproximadamente 0,1 nM o menos de aproximadamente 0,1 nM.
9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antagonista del NGF no es para la co-administración con un analgésico opioide.
10. Un anticuerpo anti-NGF para su uso en el tratamiento del dolor de cáncer de hueso moderado a severo en un individuo, en el que el anticuerpo inhibe la unión del NGF humano a trkA y/o p75; y en el que el dolor de cáncer de hueso es de cáncer asociado a metástasis de hueso con actividad osteoblástica.

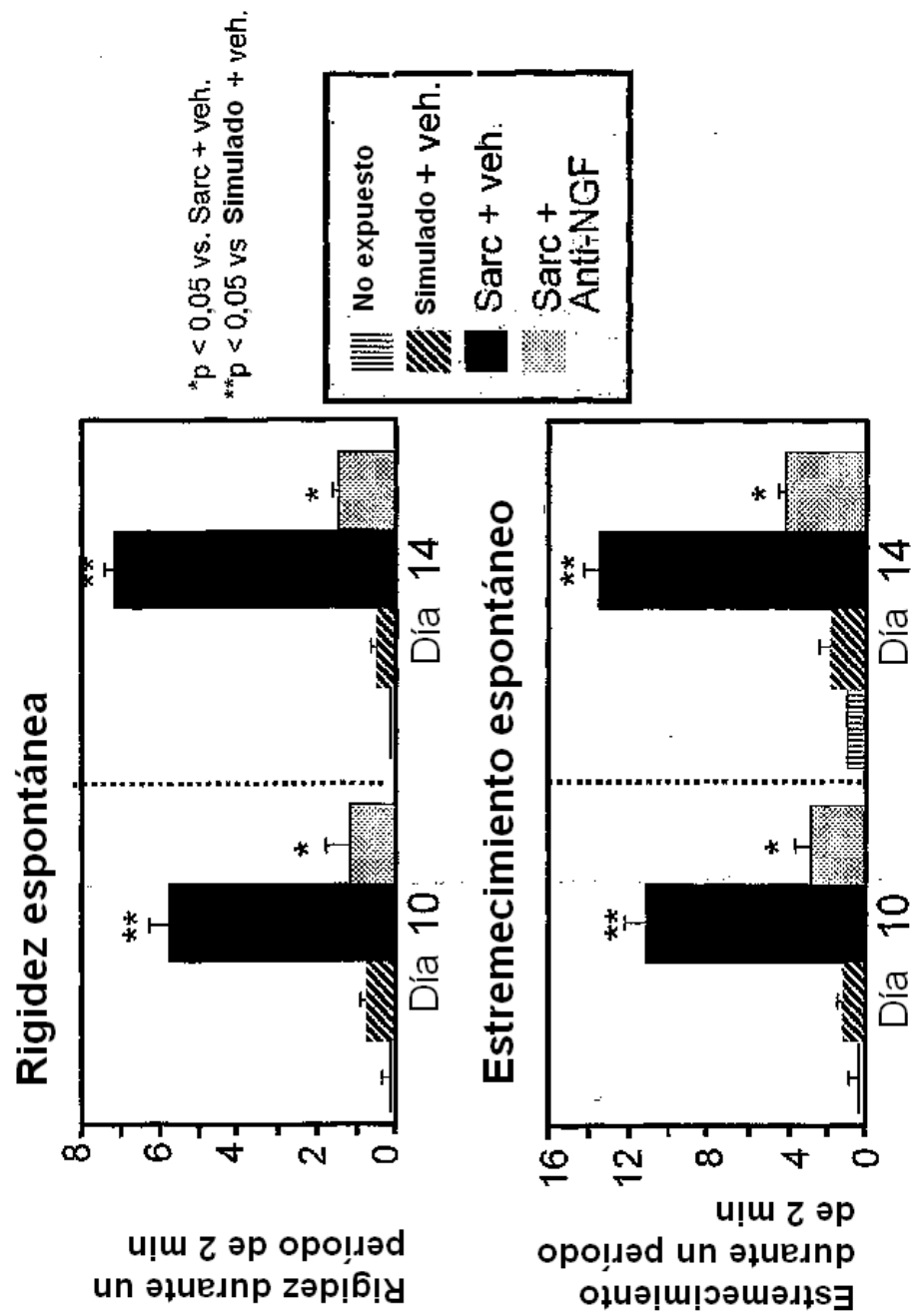


Figura 1

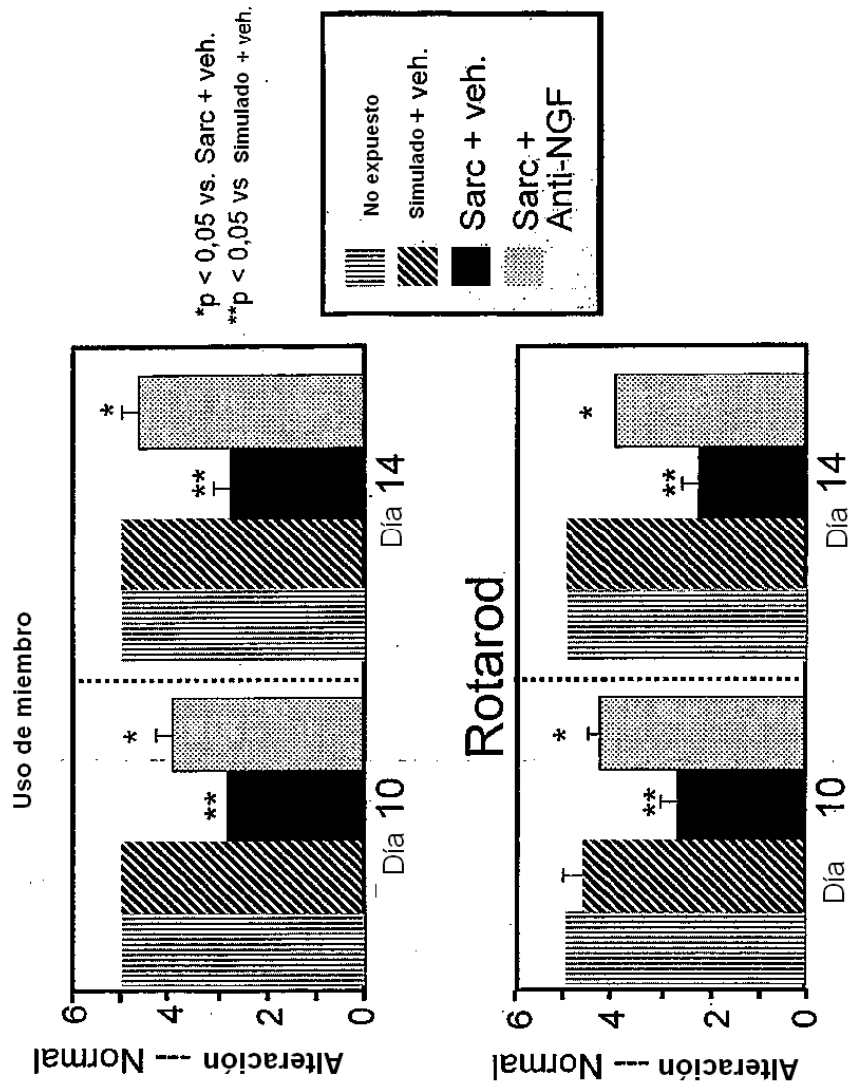


Figura 2

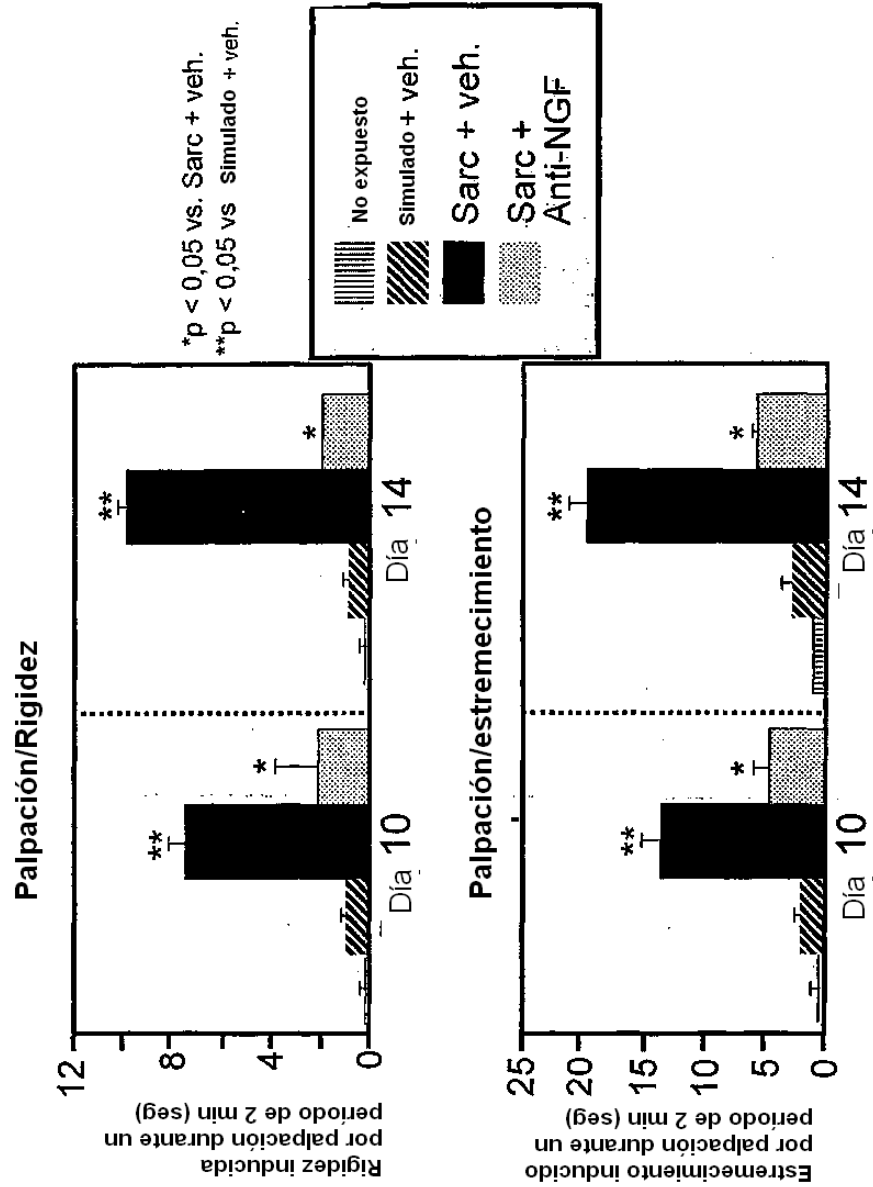


Figura 3

FIG. 4

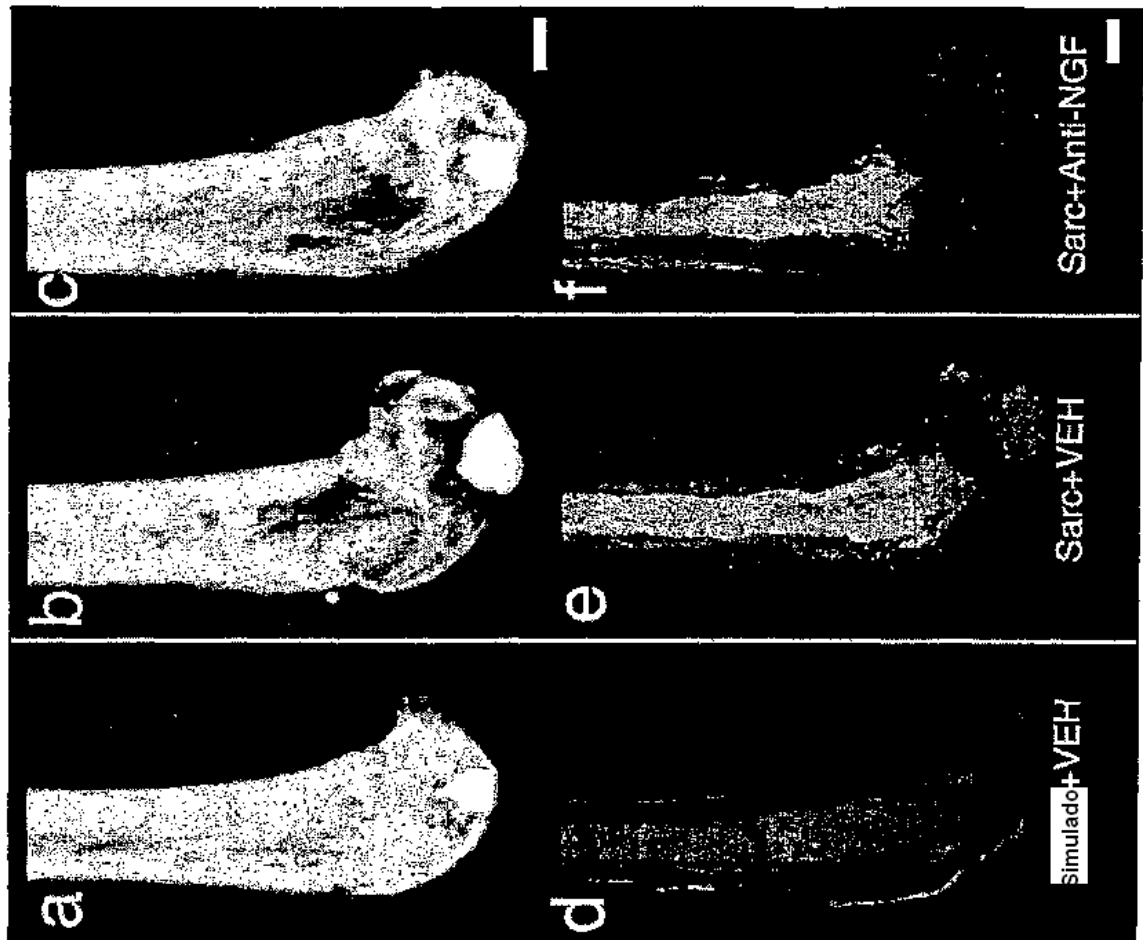


FIG. 5

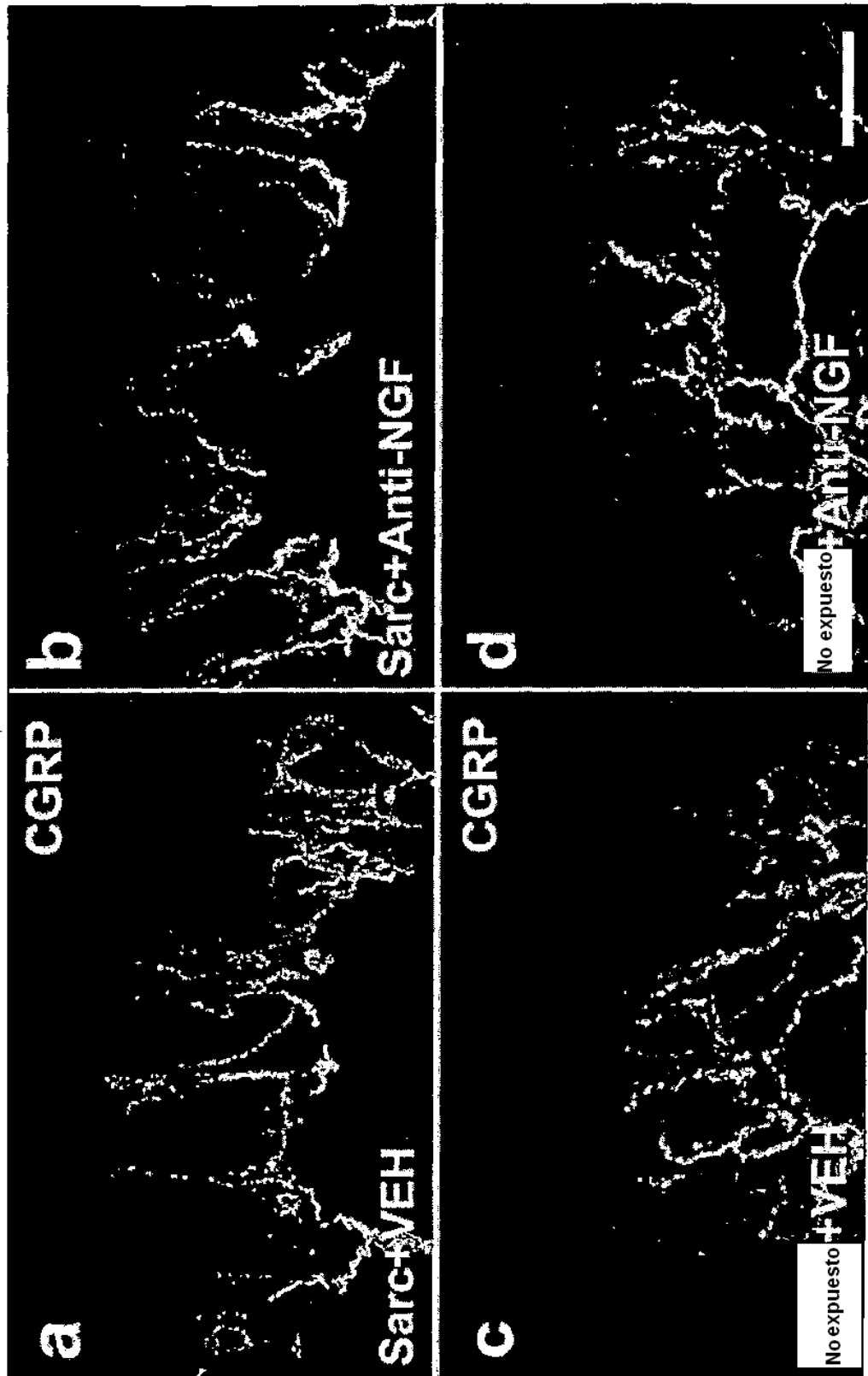


FIG. 6

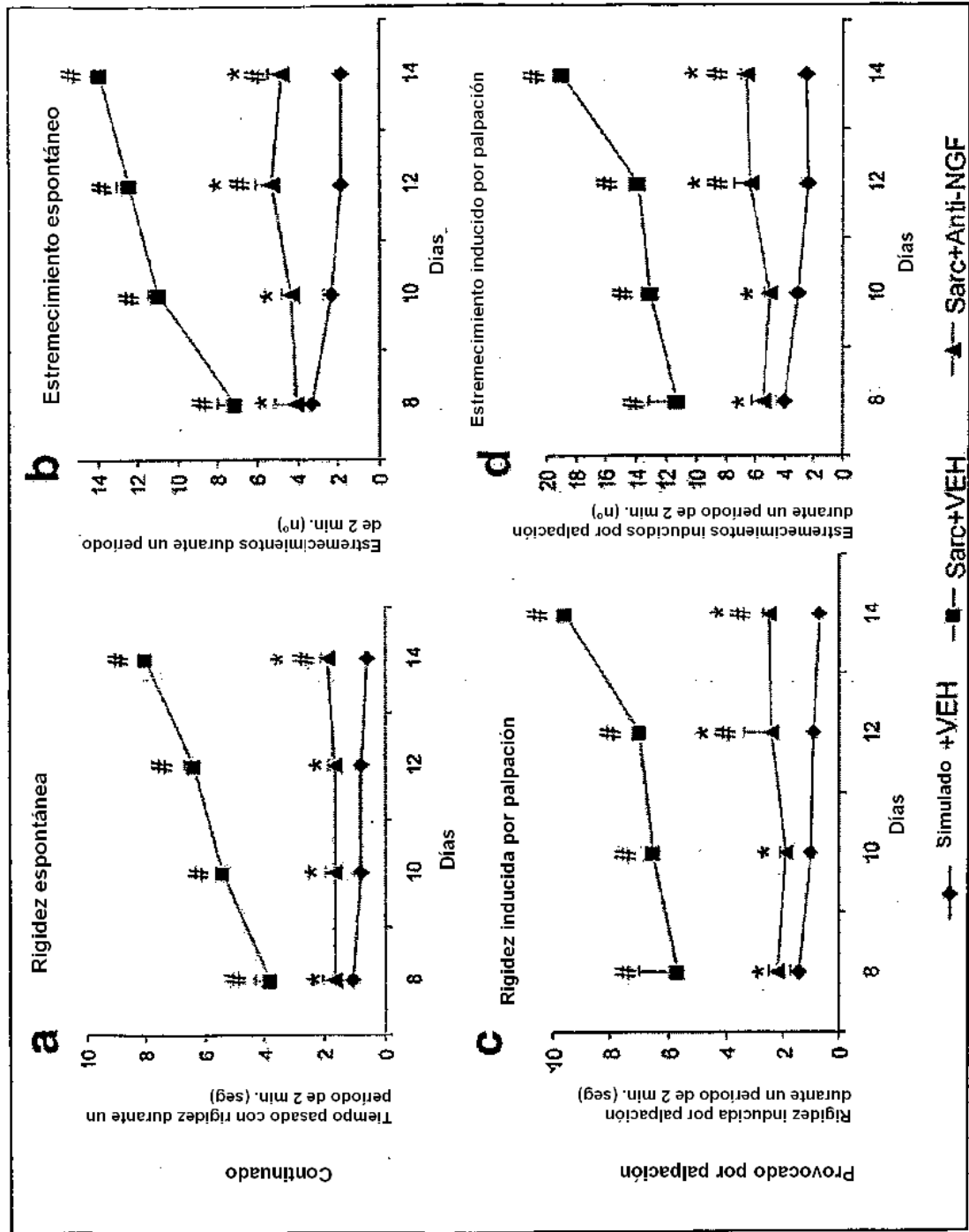


FIG. 7

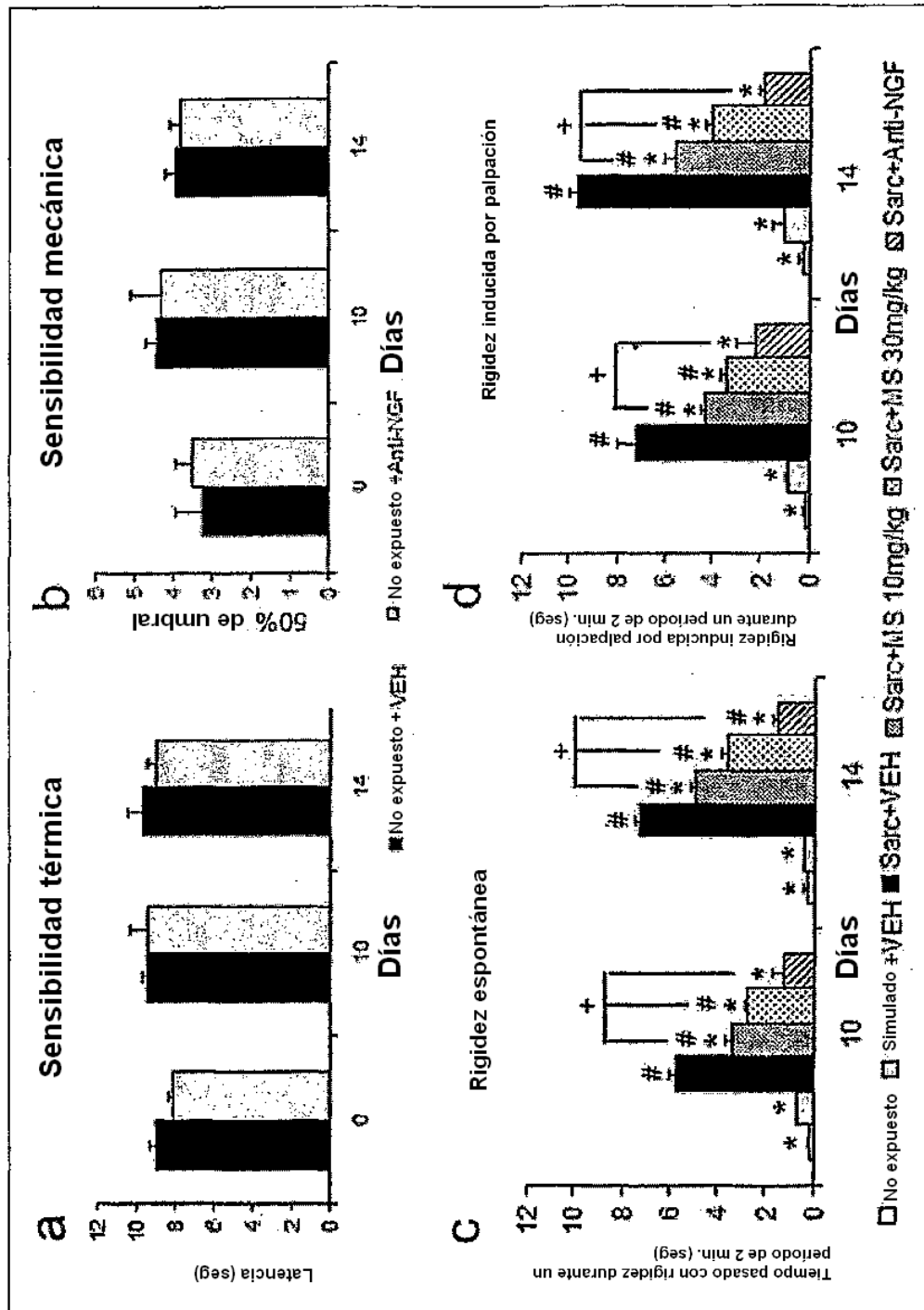


FIG. 8

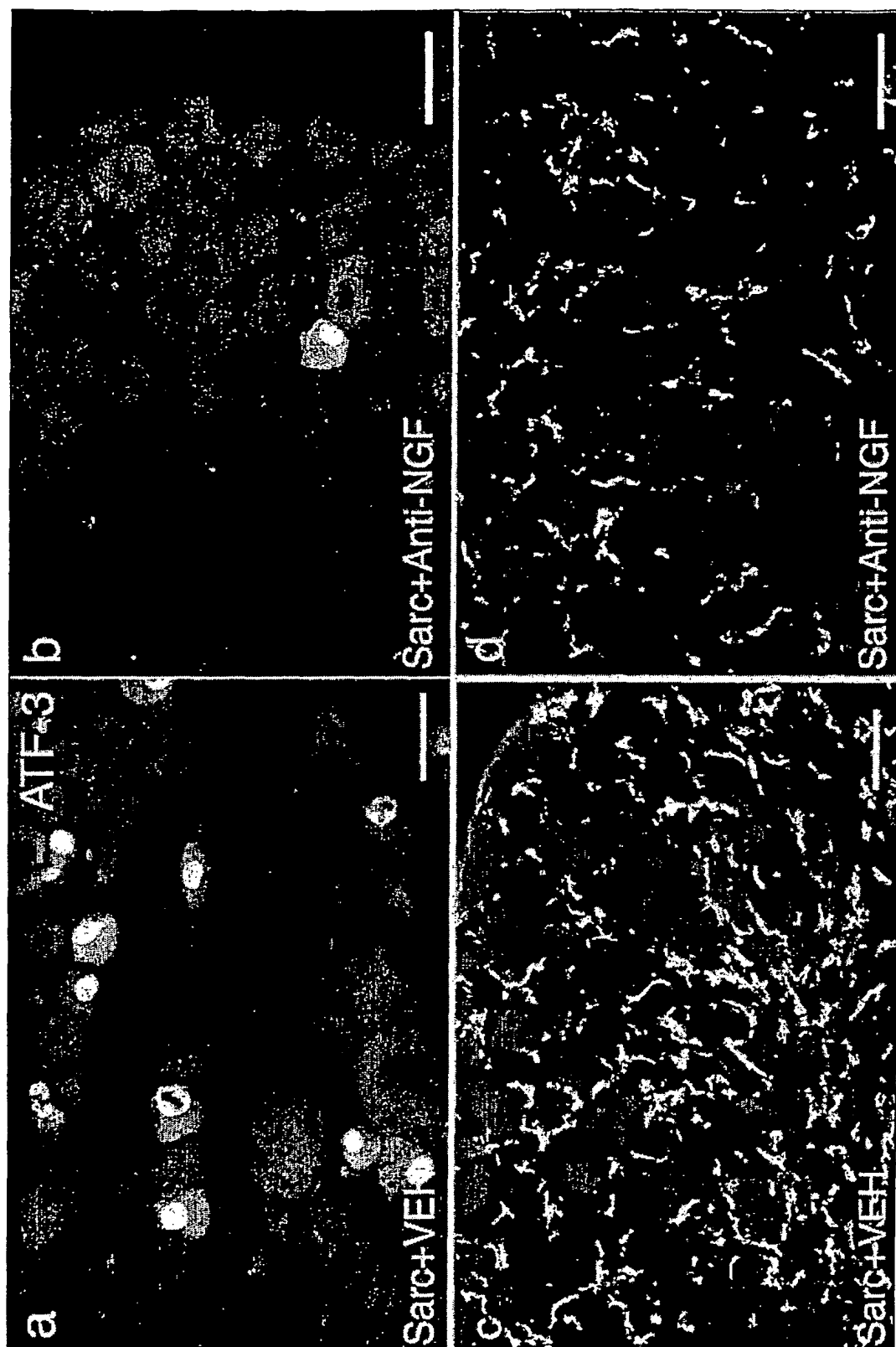


FIG. 9

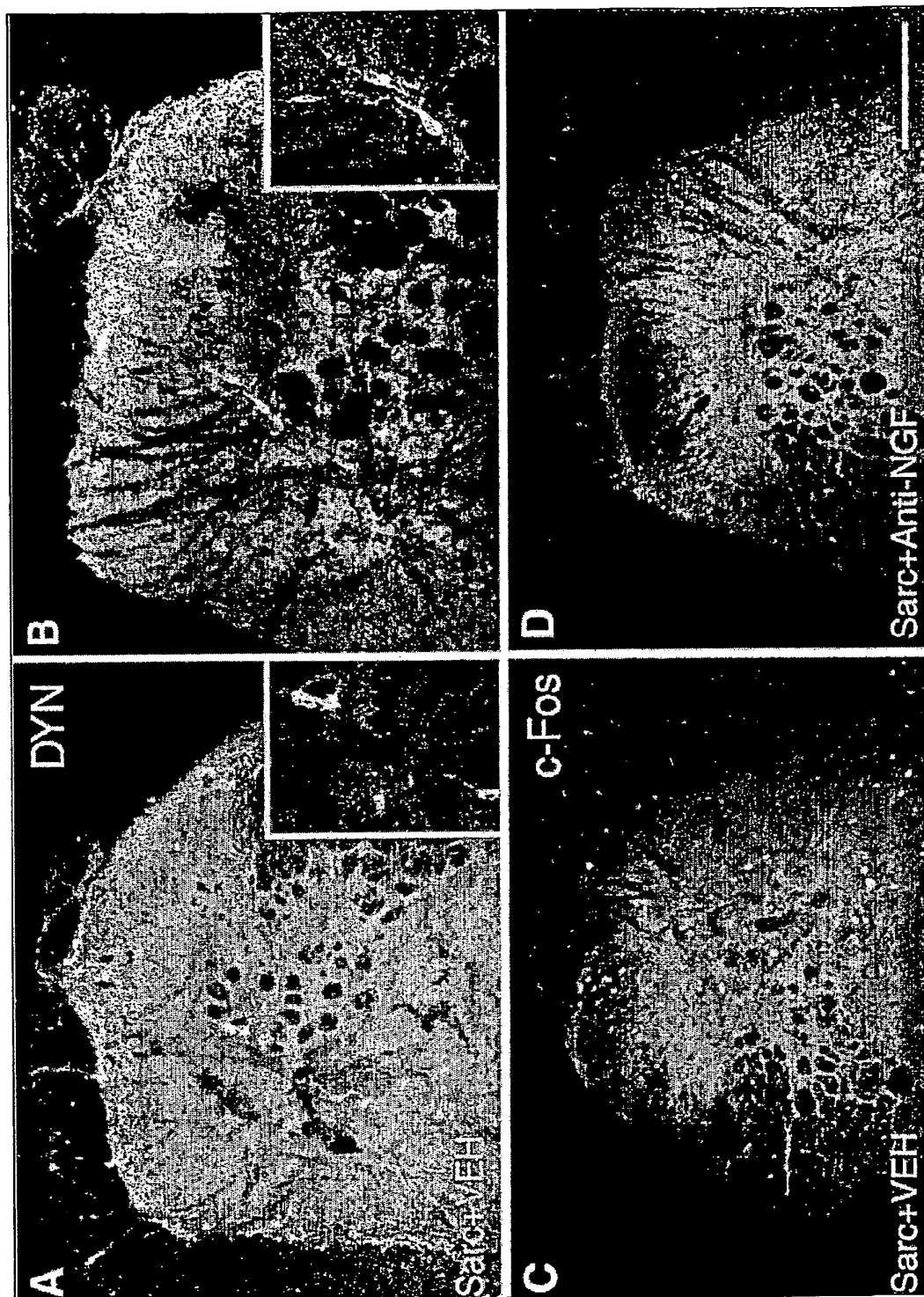


Figura 10 (A-F)

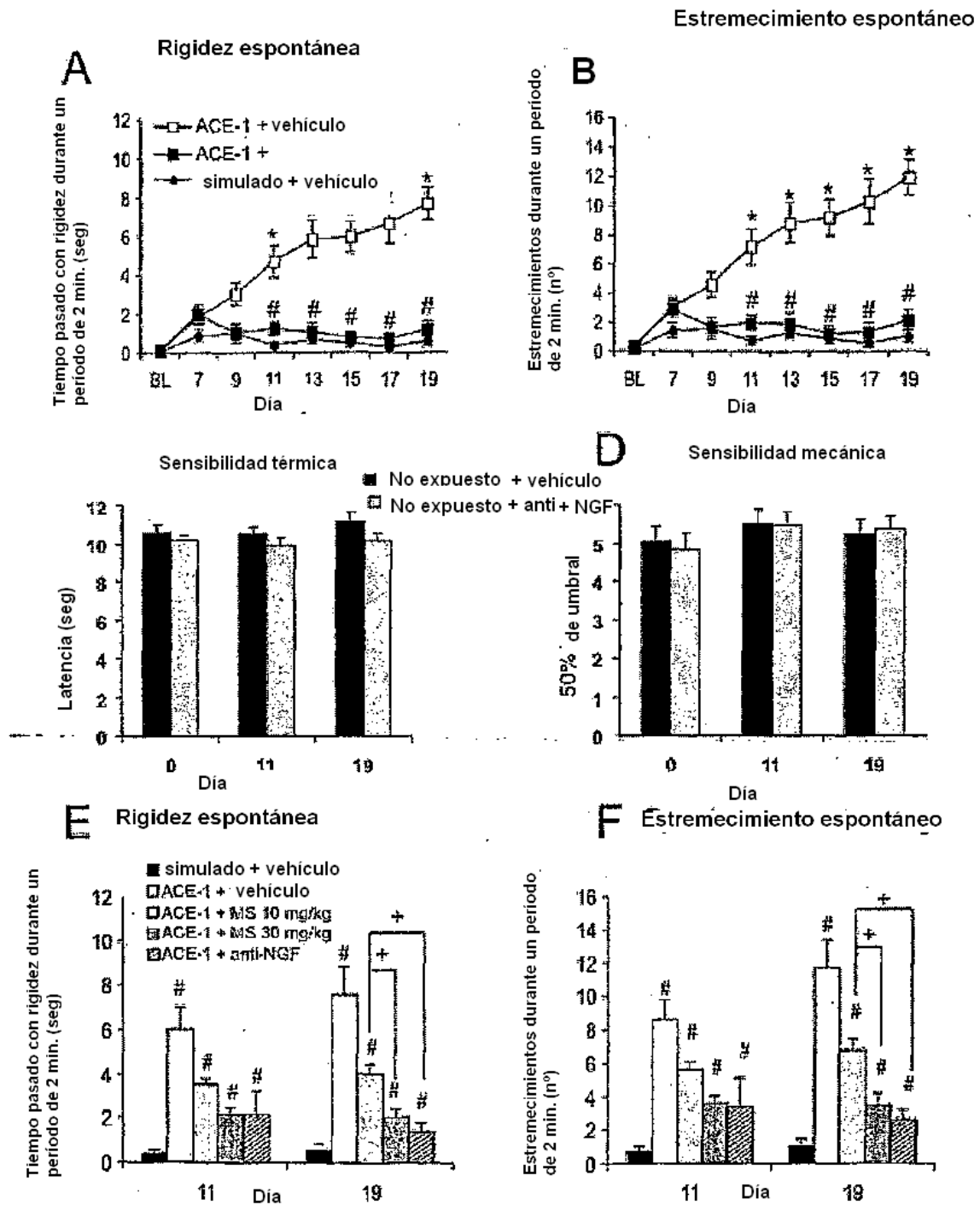


Figura 10 (G, H)

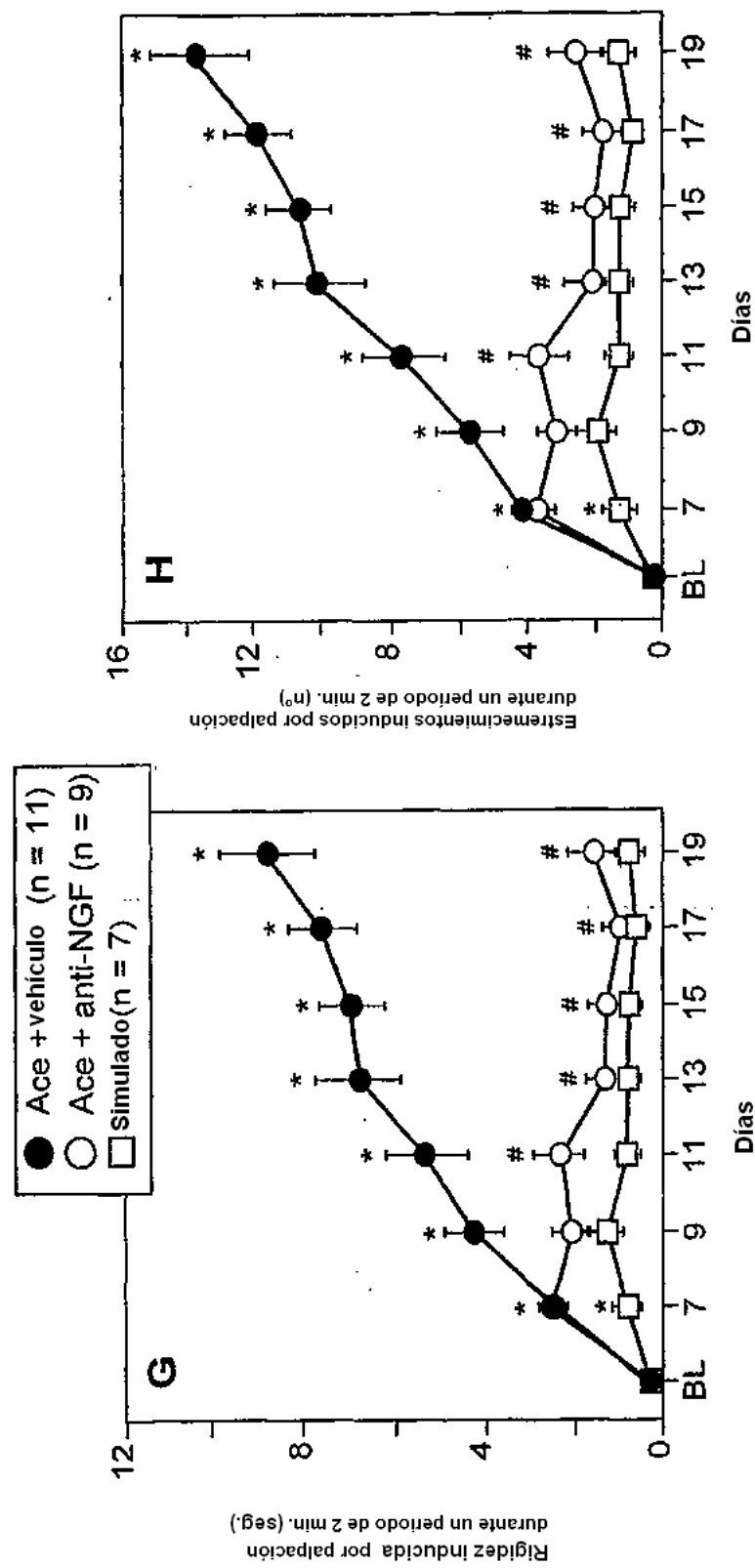


Figura 11

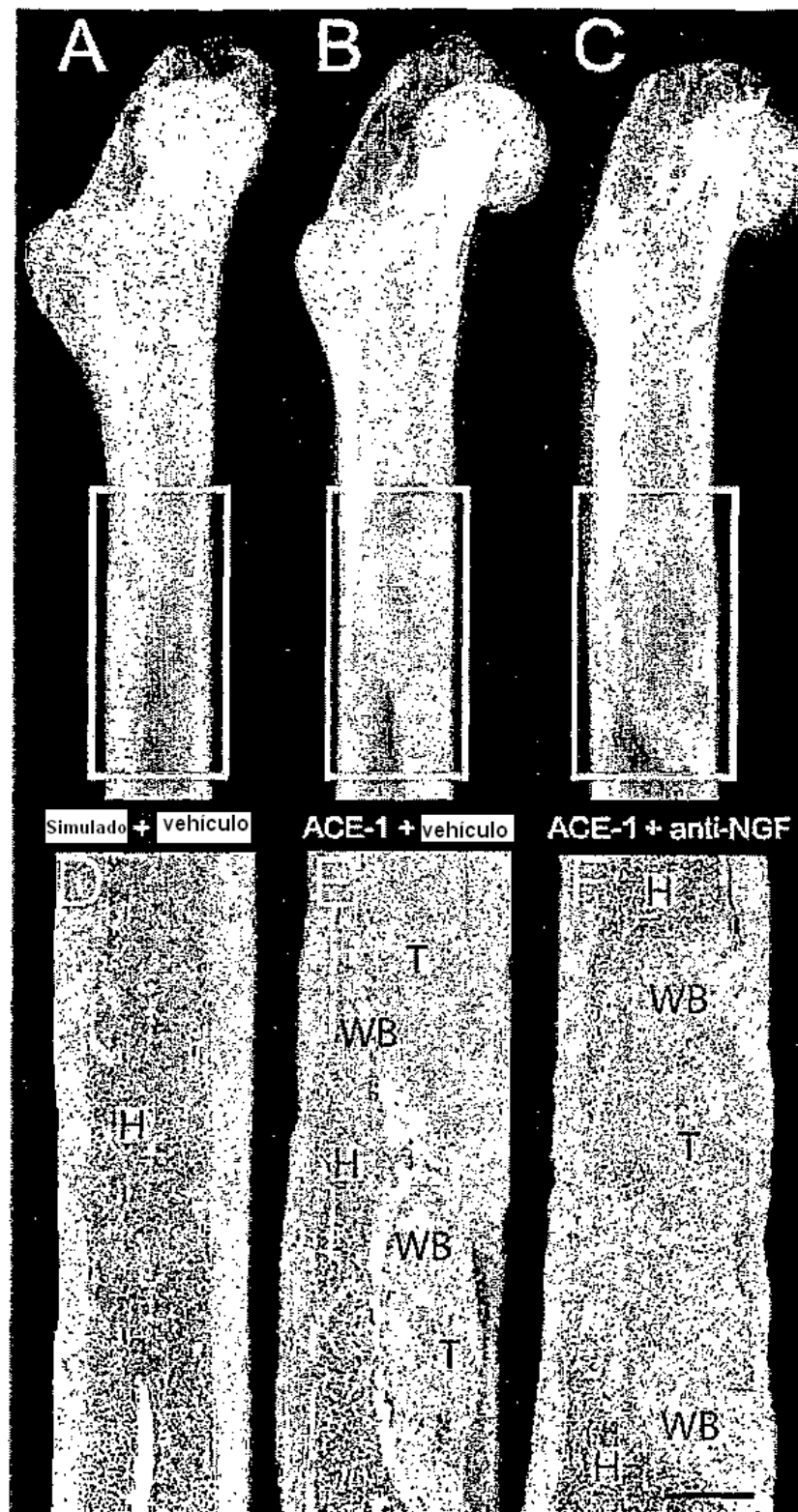


Figura 12

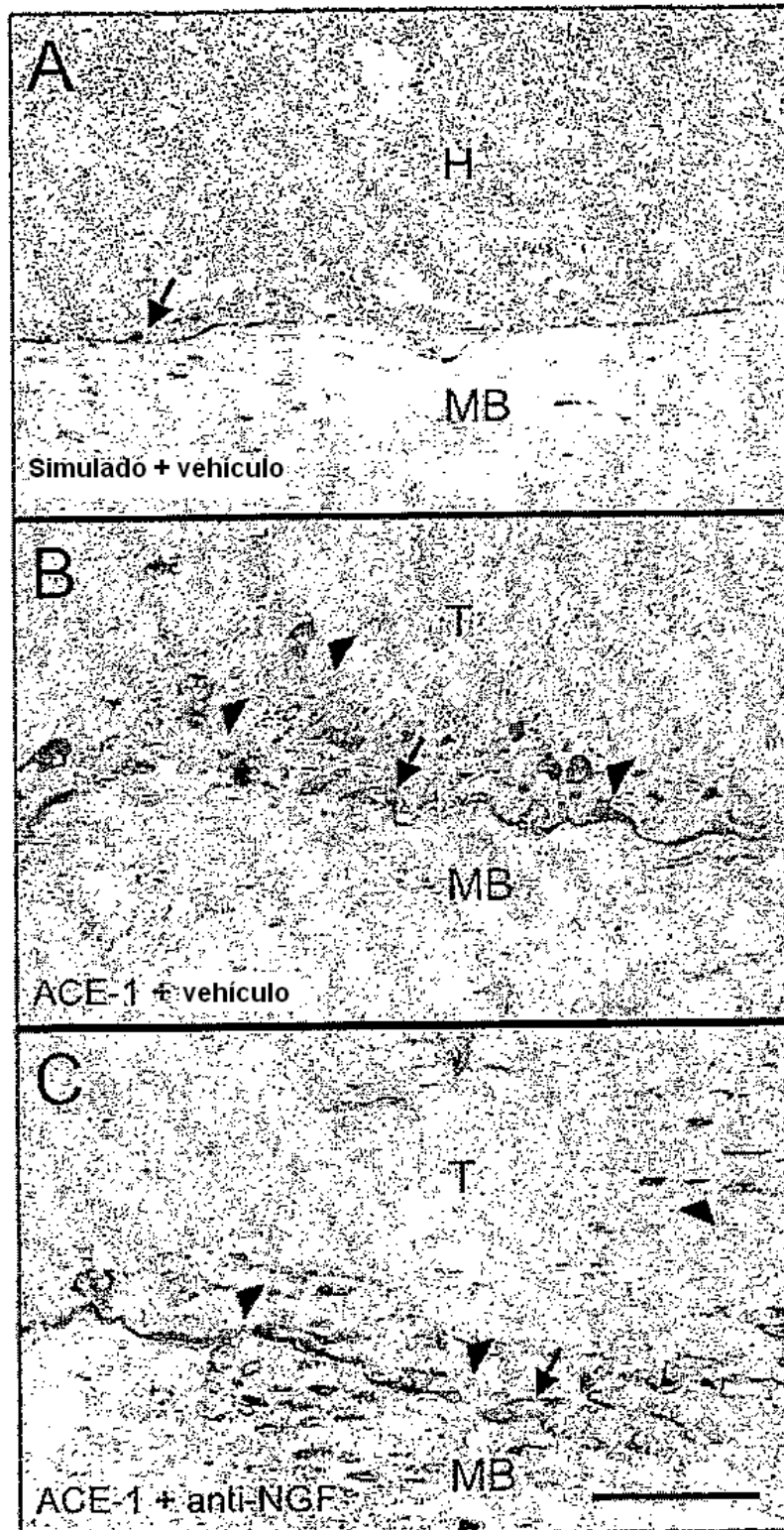


Figura 13

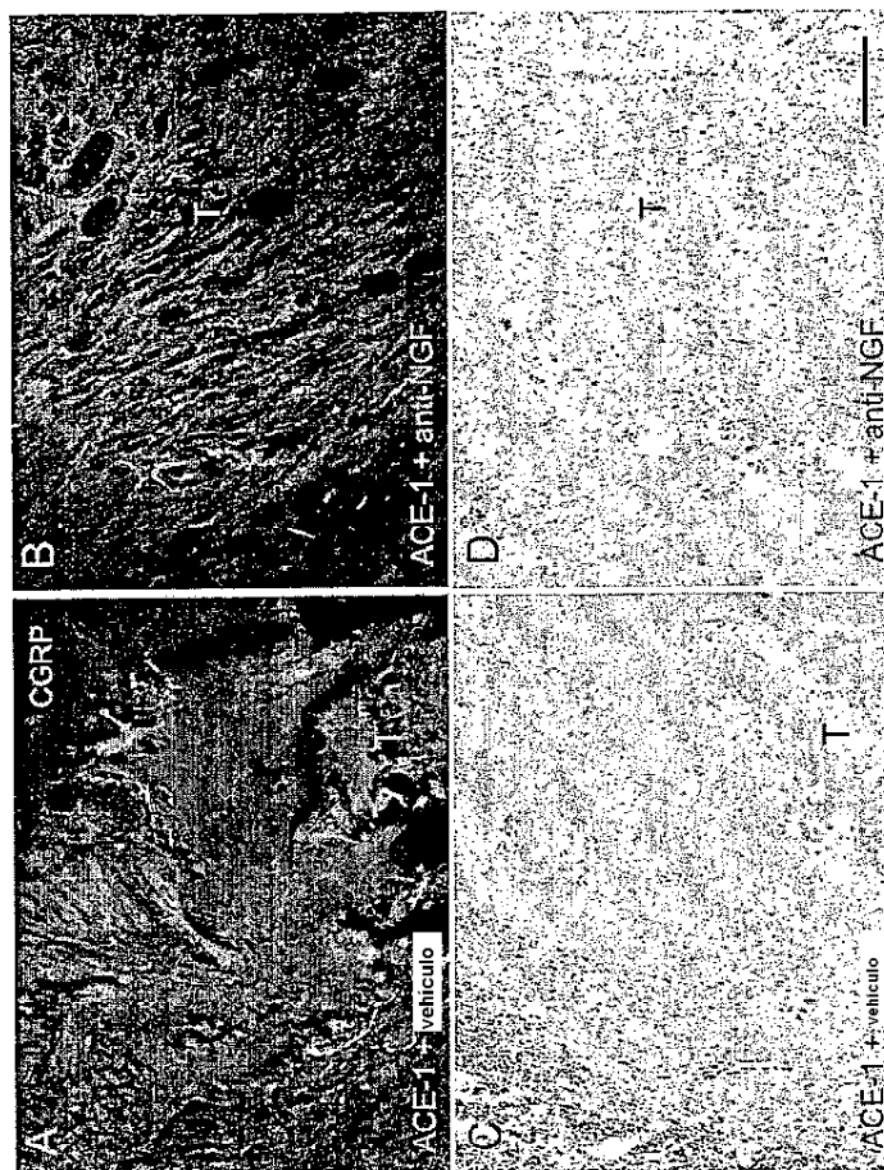


Figura 14

