

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 767 744**

51 Int. Cl.:

A61P 25/04 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 31/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/485 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2003 E 09163527 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2100902**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento del dolor postquirúrgico administrando un anticuerpo antagonista contra el factor del crecimiento nervioso y un analgésico opiáceo, y composiciones que los contienen**

30 Prioridad:

08.10.2002 US 417347 P

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

18.06.2020

73 Titular/es:

**RINAT NEUROSCIENCE CORP. (100.0%)
230 EAST GRAND AVENUE
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**SHELTON, DAVID L. y
VERGARA, GERMAN J.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 767 744 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 postquirúrgico administrando un anticuerpo antagonista contra el factor del crecimiento nervioso y un analgésico opiáceo, y composiciones que los contienen

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para la prevención o el tratamiento del dolor en un paciente mediante la administración de una combinación de un antagonista del factor de crecimiento nervioso y un analgésico opiáceo.

Antecedentes de la invención

- 10 El dolor agudo normalmente se trata con analgésicos opiáceos que desafortunadamente presentan muchos efectos secundarios no deseables que incluyen una movilidad gástrica reducida, cólico renal, obnubilación mental, y depresión respiratoria. El factor de crecimiento nervioso (NGF, siglas del inglés *Nerve Growth Factor*) fue la primera neurotrofina identificada y su papel se ha caracterizado bien en el desarrollo y en la supervivencia de neuronas tanto centrales como periféricas. El NGF ha demostrado ser un factor crítico en la supervivencia y el mantenimiento en el desarrollo de neuronas sensoriales simpáticas periféricas y embrionarias y neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (Smeyne, y col., *Nature* 368:246-249 (1994); Crowley, y col., *Cell* 76: 1001-1011 (1994)). El NGF regula el incremento de la expresión de neuropéptidos en neuronas sensoriales (Lindsay, y col., *Nature* 337: 362-364 (1989)) y su actividad está mediada a través de dos receptores unidos a membrana diferentes, el receptor tirosina quinasa TrkA y el receptor p75, que está estructuralmente relacionado con otros miembros de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (Chao, y col., *Science* 232:518-521 (1986)).

- 20 Además de sus efectos sobre el sistema nervioso central, el NGF se ha ido implicando progresivamente en procesos ajenos al sistema nervioso. Por ejemplo, el NGF administrado exógenamente, ha demostrado mejorar la permeabilidad vascular (Otten, y col., *Eur. J. Pharmacol.* 106: 199-201 (1984)), mejorar las respuestas inmunitarias de las células T y B (Otten, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10059-10063 (1989)), inducir la diferenciación de linfocitos y la proliferación de mastocitos y provocar la liberación de señales biológicas solubles de los mastocitos (Matsuda, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 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)).

- 30 El NGF es producido por una serie de tipos celulares que incluyen mastocitos (Leon, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 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 de músculo liso (Ueyama, y col., *J. Hypertens.* 11: 1061-1065 (1993)), fibroblastos (Lindholm, y col., *Eur. J. Neurosci.* 2: 795-801 (1990)), células del epitelio bronquial (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 de músculo esquelético (Schwartz, y col., *J. Photochem. Photobiol. B* 66: 195-200 (2002)). Los receptores NGF se han encontrado en una variedad de tipos celulares ajenos al sistema nervioso. Por ejemplo, la TrkA se ha encontrado en monocitos humanos, linfocitos T y B y mastocitos.

- 35 Se ha observado una asociación entre niveles incrementados de NGF y una variedad de dolencias inflamatorias en pacientes humanos así como en diversos modelos animales. Éstas incluyen lupus eritematoso sistémico (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 (Okragly, y col., *J. Urology* 161: 438-441 (1999)) y asma (Braun, y col., *Eur. J. Immunol.* 28: 3240-3251 (1998)).

- 45 De forma consistente, un nivel elevado de NGF en tejidos periféricos está asociado a hiperalgesia e inflamación y se ha observado en una serie de formas de artritis. La sinovia de pacientes afectados por artritis reumatoide expresa niveles elevados de NGF mientras que en sinovia no inflamada se ha informado de que el NGF es indetectable (Aloe, y col., *Arch. Rheum.* 35: 351-355 (1992)). Se observaron resultados similares en ratas con artritis reumatoide inducida experimentalmente (Aloe, y col., *Clin. Exp. Rheumatol.* 10: 203-204 (1992)). Se ha informado de niveles elevados de NGF en ratones artríticos transgénicos junto con un incremento en el número de mastocitos (Aloe, y col., *Int. J. Tissue Reactions-Exp. Clin. Aspects* 15: 139-143 (1993)).

- 50 Hay dos categorías de medicación generales para el tratamiento del dolor, cada una que actúa a través de mecanismos diferentes y con efectos diferentes, y las dos con desventajas. La primera categoría incluye los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) que se usan para tratar el dolor suave, pero cuyo uso terapéutico está limitado por efectos gastrointestinales no deseables tales como erosión gástrica, formación de úlcera péptica o inflamación del duodeno y del colon, y toxicidad renal con un uso prolongado. La segunda categoría incluye morfina y opiáceos relacionados que se usan para tratar el dolor moderado a agudo pero cuyo uso terapéutico está limitado debido a efectos no deseables tales como estreñimiento, sedación, confusión, depresión respiratoria, obnubilación mental, cólico renal, tolerancia con el uso prolongado y riesgo de adicción. Por tanto son necesarios compuestos útiles para el tratamiento del dolor con menores o ningún efecto secundario.

Los analgésicos opiáceos son una clase bien establecida de agentes analgésicos. A veces también se denominan

opioides. El término opiáceo (denominado de forma intercambiable "analgésico opiáceo") es aceptado de forma general para referirse en un sentido genérico a todos los fármacos, naturales y sintéticos, con actividades similares a la morfina. Los analgésicos opiáceos sintéticos y semisintéticos son derivados de cinco clases químicas de compuestos: fenantrenos; fenilheptilaminas; fenilpiperidinas; morfínanos; y benzomorfanos. Farmacológicamente estos compuestos tienen actividades diversas, así, algunos son agonistas fuertes en los receptores opiáceos (por ejemplo, morfina); otros son agonistas moderados a suaves (por ejemplo, codeína); otros más presentan actividad agonista-antagonista mixta (por ejemplo, nalbufina); y otros más son agonistas parciales (por ejemplo, nalorfina). Un opiáceo agonista parcial tal como la nalorfina, (el análogo de N-alquilo de la morfina) puede antagonizar los efectos analgésicos de la morfina, y cuando se administra sola puede ser un potente analgésico por derecho propio.

De todos los analgésicos opiáceos, la morfina es la más ampliamente usada. Desafortunadamente, aparte de sus propiedades terapéuticas útiles, la morfina también presenta una serie de efectos secundarios. Otra característica desafortunada es el desarrollo de tolerancia y dependencia física que puede limitar el uso clínico de esos compuestos. Por tanto existe la necesidad de desarrollar procedimientos de tratamiento que usen dosis inferiores de analgésicos opiáceos tales como la morfina, reduciendo así la incidencia de los efectos secundarios y la probabilidad de tolerancia y dependencia, y evitando de este modo el problema principal del síndrome de abstinencia asociado a la interrupción de la administración. Existe una gran necesidad de desarrollar otras formas de perfeccionamiento del tratamiento del dolor con opiáceos.

En el documento WO0037103 se desvela un compuesto para el suministro de restos terapéuticos, tal como un analgésico opioide, a las células nerviosas, por ejemplo, para aliviar el dolor. En el documento US6022875 se desvelan compuestos de 2,4-imidazolidindiona sustituidos como analgésicos. Brennan y col (Society for Neuroscience Abstracts, 24 (1-2), 1998, p880) desvelan el efecto de la proteína de fusión trkAlgG en un modelo de rata de dolor incisional. Brennan y col al (Pain, 64 (1996) 493-501) desvelan el desarrollo y la caracterización de un modelo de rata de dolor incisional. Brennan (ILAR J 1999, 40 (3), 129-136) comenta además este modelo de rata de dolor incisional y desvela que la hiperalgesia mecánica es una propiedad importante del dolor incisional.

25 **Breve resumen de la invención**

La materia objeto de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se basa en el descubrimiento de que los antagonistas del NGF son eficaces en el tratamiento del dolor en combinación con un analgésico opiáceo. Dicha terapia generalmente permite una dosificación reducida del analgésico opiáceo para lograr la misma cantidad de reducción del dolor y/o otras formas de perfeccionamiento del tratamiento del dolor con opiáceos.

En un primer aspecto, la presente invención ofrece un antagonista del factor de crecimiento nervioso (NGF) y un analgésico opiáceo para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico, por lo que el antagonista del NGF y el analgésico opiáceo en combinación proporcionan un alivio eficaz del dolor y en el que el antagonista del NGF es un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión del NGF con su receptor trkA y p75 *in vivo*. Las cantidades y relaciones relativas del antagonista del NGF y del analgésico opiáceo pueden variar. En algunas realizaciones, se administrará suficiente antagonista del NGF para así permitir la reducción de la dosis normal de analgésico opiáceo necesario para lograr el mismo grado de mejora del dolor en al menos el 50% aproximadamente. En algunas realizaciones, se administrará suficiente antagonista del NGF para así permitir una reducción de la dosis normal de analgésico opiáceo necesario para lograr el mismo grado de mejora del dolor en al menos el 5% aproximadamente, en al menos el 10% aproximadamente, en al menos el 20% aproximadamente, en al menos el 30% aproximadamente, en al menos el 40% aproximadamente, en al menos el 60% aproximadamente, en al menos el 70% aproximadamente, en al menos el 80% aproximadamente, o en al menos el 90% aproximadamente o superior.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un antagonista del factor de crecimiento nervioso (NGF) y un analgésico opiáceo para su uso en la mejora del tratamiento del dolor con un analgésico opiáceo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un analgésico opiáceo junto con una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF. La administración en combinación, como se usa en el presente documento, comprende la administración simultánea y/o la administración en momentos diferentes. La administración en combinación también engloba la administración en forma de co-formulación (es decir, el antagonista del NGF y el analgésico opiáceo están presentes (combinados) en la misma composición) y/o la administración en forma de composiciones separadas. Como se usa en el presente documento, "administración en combinación" está previsto que englobe cualquier circunstancia en la que el analgésico opiáceo y el antagonista del NGF se administran a un individuo en una cantidad eficaz. Como se describe posteriormente en el presente documento, se entiende que el antagonista del NGF y el analgésico opiáceo se pueden administrar a frecuencias y/o intervalos de dosificación diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF se puede administrar semanalmente, mientras que un analgésico opiáceo se puede administrar más frecuentemente. Se entiende que el antagonista del NGF y el analgésico opiáceo se pueden administrar usando la misma vía de administración o vías de administración diferentes, y que los regímenes de dosificación diferentes pueden variar durante el transcurso de la(s) administración(es). La administración puede ser antes del comienzo del dolor.

En otro aspecto la divulgación proporciona un antagonista del NGF y un analgésico opiáceo para su uso en la reducción de la incidencia del dolor, aliviar el dolor, paliar el dolor, y/o retrasar el desarrollo o la progresión del dolor en un individuo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un analgésico opiáceo junto con una cantidad eficaz de un antagonista del NGF, en donde el antagonista del NGF es un anticuerpo anti-NGF.

Los usos médicos de la divulgación son adecuados para el tratamiento o la prevención de cualquier dolor de cualquier etiología, incluyendo dolor en el que en general está prescrito el uso de un analgésico opiáceo, por ejemplo, pancreatitis, cálculo renal, dolor de cabeza, dismenorrea, dolor músculo-esquelético (por ejemplo, dolor lumbar), esguince, dolor visceral, quistes en los ovarios, prostatitis, cistitis, quemaduras químicas o térmicas, o cáncer (tal como

5 cáncer de próstata metastatizado hasta el hueso, cáncer de mama que ha metastatizado hasta el hueso, cáncer de pulmón que ha metastatizado hasta hueso, cáncer pancreático).

En una realización, el anticuerpo anti-NGF reconoce el NGF humano. En otras realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-NGF se une específicamente al NGF humano. En otras realizaciones más el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo 6 del NGF que un anticuerpo seleccionado de uno cualquiera 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)). En alguna realización, el antagonista del NGF se une al NGF (tal como hNGF) y no se une significativamente a neurotrofinas relacionadas, tales como NT-3, NT4/5, y/o BDNF. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF está humanizado (tal como el anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En otras realizaciones más, 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 del anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o, en algunas realizaciones, las seis CDR de E3). En otras realizaciones, el anticuerpo es humano. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 2). En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no desencadena la lisis mediada por el complemento, o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624; publicación PCT N.º WO9958572.

En algunas realizaciones, el antagonista del NGF se une a la molécula de NGF. En otras realizaciones más, el antagonista del NGF es un anticuerpo que se une específicamente al NGF (tal como NGF humano). Sin embargo, el antagonista del NGF puede, como alternativa, unirse al receptor Trka. El antagonista del NGF puede ser un anticuerpo monoclonal anti-NGF humano (anti-hNGF) que es capaz de unirse al hNGF e inhibir eficazmente la unión del hNGF a la TrkA humana (hTrkA) y/o inhibir eficazmente la activación del receptor TrkA.

La afinidad de unión de un anticuerpo anti-NGF al NGF (tal como hNGF) puede ser de de aproximadamente 0,10 nM a aproximadamente 0,80 nM, de aproximadamente 0,15 nM a aproximadamente 0,75 nM y de aproximadamente 0,18 a aproximadamente 0,72 nM. En una realización, la afinidad de unión está entre 2 pM y 22 pM. En alguna realización, la afinidad de unión es de 10 nM aproximadamente. En otras realizaciones, la afinidad de unión es inferior a 10 nM aproximadamente. En otras realizaciones, la afinidad de unión es de 0,1 nM aproximadamente o 0,07 nM aproximadamente. En otras realizaciones, la afinidad de unión es inferior a 0,1 nM aproximadamente o inferior a 0,07 nM aproximadamente. En otras realizaciones, la afinidad de unión es de cualquiera de 100 nM aproximadamente, 50 nM aproximadamente, 10 nM aproximadamente, 1 nM aproximadamente, 500 pM aproximadamente, 100 pM aproximadamente, o 50 pM aproximadamente a cualquiera de 2 pM aproximadamente, 5 pM aproximadamente, 10 pM aproximadamente, 15 pM aproximadamente, 20 pM aproximadamente, o 40 pM aproximadamente. En algunas realizaciones, la afinidad de unión es cualquiera de 100 nM aproximadamente, 50 nM aproximadamente, 10 nM aproximadamente, 1 nM aproximadamente, 500 pM aproximadamente, 100 pM aproximadamente, o 50 pM aproximadamente. En otras realizaciones más, la afinidad de unión es 2 pM aproximadamente, 5 pM aproximadamente, 10 pM aproximadamente, 15 pM aproximadamente, 20 pM aproximadamente, 40 pM aproximadamente, o superior a 40 pM aproximadamente. Como es bien sabido en la técnica, la afinidad de unión se puede expresar como K_D o constante de disociación y una afinidad incrementada se corresponde con una K_D reducida. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal de ratón anti-NGF 911 (Hongo y col., Hybridoma 19: 215-227 (2000)) al NGF humano es de 10 nM aproximadamente, y la afinidad de unión del anticuerpo E3 (descrito en el presente documento) humanizado al NGF humano es de 0,07 nM aproximadamente.

El anticuerpo anti-NGF puede ser un fragmento de anticuerpo, incluyendo un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo constituido por fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo, y una molécula Fv de cadena sencilla (scFv).

El analgésico opiáceo puede ser cualquier compuesto que presente actividad biológica similar a la morfina. En algunas realizaciones, el analgésico opiáceo es uno o más de los siguientes: morfina, codeína, dihidrocodeína, diacetilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, levorfanol, oximorfona, alfentanilo, buprenorfina, butorfanol, fentanilo, sufentanilo, meperidina, metadona, nalbufina, propoxifeno y pentazocina; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

El antagonista del NGF y/o el analgésico opiáceo se pueden administrar a un individuo a través de cualquier vía de administración adecuada. Por ejemplo, se pueden administrar juntos o por separado, y/o simultánea y/o secuencialmente, por vía oral, intravenosa, sublingual, subcutánea, intraarterial, intramuscular, rectal, intraespinal,

intratorácica, intraperitoneal, intraventricular, sublingual, transdérmica o por inhalación. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, intravenosa, o localizada.

5 En un segundo aspecto, la presente invención ofrece composiciones que comprenden un anticuerpo anti-NGF y un analgésico opiáceo para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico. El anticuerpo anti-NGF y el analgésico opiáceo pueden estar presentes junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, o pueden estar presentes en composiciones separadas. En otro aspecto, la invención proporciona una composición sinérgica de un anticuerpo anti-NGF y un analgésico opiáceo.

10 En un tercer aspecto, la presente invención ofrece un kit para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico, comprendiendo dicho kit un anticuerpo anti-NGF y un analgésico opiáceo. El kit puede comprender adicionalmente instrucciones para cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. Las instrucciones pueden comprender la administración de un anticuerpo anti-NGF en combinación con un opiáceo (es decir, administración simultánea y/o administración en momentos diferentes). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF y el analgésico opiáceo están empaquetados juntos, pero pueden estar, o no, en el mismo recipiente. Así, en algunas realizaciones, el kit comprende un anticuerpo anti-NGF y un analgésico opiáceo presentes en el mismo recipiente, e instrucciones para su uso en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En otras realizaciones, el kit comprende un anticuerpo anti-NGF y un opiáceo presentes en recipientes separados.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 representa que la puntuación de dolor acumulativo se redujo en animales tratados con morfina en combinación con un antagonista del NGF, el anticuerpo de ratón anti-NGF 911, Hongo, y col., Hybridoma 19: 215-227 (2000). El tratamiento preoperatorio con anticuerpo anti-NGF ("911") solo a 0,3 mg/kg fue más eficaz en la reducción del dolor en reposo que 0,3 mg/kg de morfina sola, y el tratamiento con anticuerpo anti-NGF en combinación con morfina fue más eficaz en la reducción del dolor en reposo que la morfina sola o el anticuerpo anti-NGF solo.

25 La Figura 2 representa que la puntuación de dolor acumulativo se redujo en animales tratados con morfina en combinación con un agonista del NGF, el anticuerpo anti-NGF 911. El tratamiento con un anticuerpo anti-NGF más morfina fue más eficaz en la reducción del dolor en reposo que la morfina sola o el anticuerpo anti-NGF solo.

30 La Figura 3 representa la puntuación de dolor en reposo observada después de cirugía y tratamiento con anticuerpo anti-NGF y/o morfina. Los animales se trataron con un antagonista del NGF, el anticuerpo anti-NGF 911, 15 horas antes de la cirugía y se sometieron a pruebas para el comportamiento al dolor un día después de la cirugía. Los animales se sometieron a pruebas sin morfina (curva continua), con 0,3 mg/kg de morfina (curva rayada) o con 1,0 mg/kg de morfina (curva punteada). El tratamiento con 0,3 mg/kg de morfina en combinación con 0,3 mg/kg de anticuerpo anti-NGF o con 1,0 mg/kg de anticuerpo anti-NGF mejoró significativamente el alivio del dolor (es decir, redujo el dolor en reposo) comparado con el tratamiento con 0,3 mg/kg de morfina sola. Además, el tratamiento con anticuerpo anti-NGF solo proporcionó un alivio del dolor similar a la morfina dosificada a 0,3 mg/kg. El tratamiento con anticuerpo anti-NGF a 1,0 mg/kg más 0,3 mg/kg de morfina produjo un alivio del dolor al menos igual al obtenido con 1,0 mg/kg de morfina sola.

Descripción detallada de la invención

40 Los inventores han descubierto que el dolor se puede tratar o prevenir administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF, en combinación con un analgésico opiáceo. Los usos médico y composiciones de la presente divulgación son útiles para el tratamiento o la prevención del dolor cuando está prescrito de forma general el uso de un analgésico opiáceo. Con el uso de un antagonista de los factores de crecimiento nerviosos (anticuerpo anti-NGF) y un analgésico opiáceo en combinación, de acuerdo con la presente divulgación ahora es posible tratar el dolor con una dosis inferior de analgésico opiáceo, reduciendo así la probabilidad de los efectos secundarios asociados al uso de analgésicos opiáceos (por ejemplo, depresión respiratoria, estreñimiento, cólico renal, náuseas y vómitos, y tolerancia y dependencia y los problemas asociados a la privación del fármaco). En algunas realizaciones, se administrará suficiente anticuerpo anti-NGF para así permitir una reducción de la dosis normal de analgésico opiáceo necesario para lograr el mismo grado de mejora del dolor en al menos el 5% aproximadamente, al menos el 10% aproximadamente, al menos el 20% aproximadamente, al menos el 30% aproximadamente, al menos el 50% aproximadamente, al menos el 60% aproximadamente, al menos el 70% aproximadamente, al menos el 80% aproximadamente, o al menos el 90% aproximadamente, o superior.

El tratamiento del dolor con un analgésico opiáceo también se puede mejorar como se describe en el presente documento, mediante la administración del analgésico opiáceo en combinación con un anticuerpo anti-NGF.

55 La invención proporciona un antagonista del factor de crecimiento nervioso (NGF) y un analgésico opioide para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico en un individuo (incluido un mamífero, tanto humano como no humano), en el que el antagonista de NGF es un anticuerpo anti-NGF. La divulgación proporciona usos médicos para mejorar el tratamiento con analgésicos opioides o la prevención del dolor en un individuo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF junto con una cantidad eficaz de un analgésico opioide. La divulgación proporciona procedimientos para prevenir, mejorar y/o prevenir el desarrollo o la progresión del dolor.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es capaz de unirse al NGF e inhibir eficazmente la unión del NGF a su receptor TrkA y/o p75 *in vivo*, y/o inhibir eficazmente la activación por parte del NGF de su receptor TrkA y/o p75.

En otro aspecto, la divulgación proporciona usos médicos para mejorar, retrasar el desarrollo y/o prevenir la progresión del dolor.

- 5 Analgésicos opiáceos ejemplares de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, morfina, codeína, dihidrocodeína, diacetilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, levorfanol, oximorfona, alfentanilo, buprenorfina, butorfanol, fentanilo, sufentanilo, meperidina, metadona, nalbufina, propoxifeno y pentazocina; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el analgésico opiáceo es morfina; o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 10 Sales de analgésicos opiáceos ejemplares de uso en la presente invención incluyen sulfato de morfina, clorhidrato de morfina, tartrato de morfina, fosfato de codeína, sulfato de codeína, bitartrato de dihidrocodeína, clorhidrato de diacetilmorfina, bitartrato de hidrocodona, clorhidrato de hidromorfona, tartrato de levorfanol, clorhidrato de oximorfona, clorhidrato de alfentanilo, clorhidrato de buprenorfina, tartrato de butorfanol, citrato de fentanilo, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de metadona, clorhidrato de nalbufina, clorhidrato de propoxifeno, napsilato de propoxifeno (monohidrato del ácido 2-naftalensulfónico(1:1)), y clorhidrato de pentazocina. En una realización, el analgésico opiáceo es sulfato de morfina.
- 15

Los usos médicos y composiciones de la presente divulgación son útiles para el tratamiento del dolor de cualquier etiología, incluyendo dolor agudo y crónico, cualquier dolor con un componente inflamatorio, y cualquier dolor en el que normalmente está prescrito un analgésico opiáceo. Ejemplos de dolor incluyen dolor postquirúrgico, dolor posoperatorio (incluyendo dolor dental), migrañas, dolores de cabeza y neuralgia trigeminal, dolor asociado a quemaduras, heridas o cálculos renales, dolor asociado a traumatismos (incluyendo traumatismos craneoencefálicos), dolor neuropático, dolor asociado a trastornos músculo-esqueléticos tales como artritis reumatoide, artrosis, cistitis, pancreatitis, enfermedad inflamatoria del intestino, espondilitis anquilosante, artropatías sero-negativas (no reumatóides), reumatismo no articular y trastornos peri-articulares, y dolor asociado a cáncer (incluyendo "dolor irruptivo" y dolor asociado a cáncer terminal), neuropatía periférica y neuralgia postherpética. Ejemplos de dolor con un componente inflamatorio (además de algunos de aquellos descritos anteriormente) incluyen dolor reumático, dolor asociado a mucositis, y dismenorrea. Los usos médicos y composiciones de la presente invención se usan para el tratamiento del dolor postquirúrgico.

20

25

El anticuerpo anti-NGF y/o el analgésico opiáceo se pueden administrar a un individuo a través de cualquier vía de administración adecuada. Por ejemplo, se pueden administrar juntos o por separado, y/o simultánea y/o secuencialmente, por vía oral, intravenosa, sublingual, subcutánea, intraarterial, intramuscular, rectal, intraespinal, intratorácica, intraperitoneal, intraventricular, sublingual, transdérmica o por inhalación. La administración puede ser sistémica, por ejemplo, intravenosa, o localizada.

30

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones y kits para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico que comprenden un anticuerpo anti-NGF y un analgésico opiáceo. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es capaz de inhibir eficazmente la unión del NGF a su receptor(es) TrkA y/o p75 y/o inhibir eficazmente la activación por parte del NGF de su receptor(es) TrkA y/o p75.

35

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de los conocimientos en la técnica. Tales técnicas están completamente explicadas 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.I. Freshney, ed., 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds.); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel 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 y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

40

45

50

Definiciones

55

Un "anticuerpo" (usado de manera intercambiable con su forma en plural) es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento del antígeno, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, el término engloba no solo anticuerpos monoclonales o policlonales intactos, sino también sus fragmentos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), de cadena sencilla (ScFv), sus mutantes, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad necesaria. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgG, IgA, o IgM (o de sus subclases), y no es necesario que el anticuerpo sea de ninguna clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas del anticuerpo, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas se pueden dividir a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma, y mu, respectivamente. Las estructuras y configuraciones tridimensionales de las subunidades de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de anticuerpos en la que el anticuerpo monoclonal está constituido de aminoácidos (de origen natural y no de origen natural) que están involucrados en la unión selectiva de un antígeno. Una población de anticuerpos monoclonales es altamente específica, y está dirigida contra un único sitio antigénico. El término "anticuerpo monoclonal" engloba no solo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también sus fragmentos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), de cadena sencilla (ScFv), sus mutantes, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad necesaria y la capacidad de unirse a un antígeno. No se pretende que esté limitado en lo que respecta a la fuente del anticuerpo o a la manera en la que se prepara (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.).

Los anticuerpos "humanizados" se refieren a una molécula que tiene un sitio de unión a un antígeno que se ha obtenido sustancialmente de una inmunoglobulina procedente de especies no humanas y el resto de la estructura de la molécula de inmunoglobulina se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados a dominios constantes o solamente las regiones determinantes de complementariedad (CDR) insertadas sobre regiones de entramado apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión al antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificados para asemejarse más a inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias CDR (por ejemplo, un anticuerpo humanizado de ratón que contienen 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, los restos de la región de entramado (FR) u otros restos de la inmunoglobulina humana son reemplazados por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante.

Como se usa en el presente documento, el término "factor de crecimiento nervioso" y "NGF" se refiere al factor de crecimiento nervioso y a sus variantes que retienen al menos parte de la actividad del NGF. Como se usa en el presente documento, el NGF incluye todos los NGF de secuencia nativa de especies de mamíferos, incluyendo la especie humana, canina, felina, equina, o bovina.

El "receptor NGF" se refiere a un polipéptido que se une o se activa con el NGF. Los receptores NGF incluyen el receptor TrkA y el receptor p75 de cualquier especie de mamífero, incluyendo, pero no limitado a, la especie humana, canina, felina, equina, primate, o bovina.

Un "antagonista del NGF" se refiere a cualquier molécula que bloquea, suprime o reduce (incluyendo significativamente) la actividad biológica del NGF, incluyendo las vías aguas abajo mediadas por la señalización del NGF, tales como la unión al receptor y/o la estimulación de una respuesta celular al NGF. El término "antagonista" implica un mecanismo no específico de cualquier acción biológica, y se considera para incluir y englobar expresamente todas las posibles interacciones farmacológicas, fisiológicas, y bioquímicas con el NGF, ya sean directas o indirectas, o ya sea la interacción con el NGF, su receptor, o a través de otro mecanismo, y sus consecuencias que se pueden conseguir con una variedad de composiciones diferentes, y químicamente divergentes. Antagonistas del NGF ejemplares incluyen, pero no están limitados a, un anticuerpo anti-NGF, una molécula antisentido dirigida a un NGF (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica un NGF), un compuesto inhibitorio del NGF, un análogo estructural del NGF, una mutación negativa dominante de un receptor TrkA que se une a un NGF, una inmunoadhesina TrkA, un anticuerpo anti-TrkA, un anticuerpo anti-p75, y un inhibidor de quinasa. Para los propósitos de la presente divulgación, se entenderá explícitamente que el término "antagonista" engloba todos los términos, títulos, y estados y características funcionales identificados previamente, por lo que el propio NGF, una actividad biológica del NGF (incluyendo, pero no limitado a, su capacidad para mediar en cualquier aspecto del dolor), o las consecuencias de la actividad biológica, son sustancialmente anulados, reducidos, o neutralizados en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un antagonista del NGF (por ejemplo, un anticuerpo) se une (interacciona físicamente con) al NGF, se une a un receptor NGF (tal como el receptor TrkA y/o el receptor p75), reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor NGF aguas abajo, y/o inhibe (reduce) la síntesis, producción o liberación del

NGF. En otras realizaciones, un antagonista del NGF se une al NGF y evita la dimerización del receptor TrkA y/o la autofosforilación de TrkA. En otras realizaciones, un antagonista del NGF inhibe o reduce la síntesis y/o producción (liberación) del NGF. En el presente documento se proporcionan ejemplos de tipos de antagonistas del NGF.

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

Una "inmunoadhesina 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 una inmunoglobulina, que retiene la especificidad de unión del receptor TrkA.

10 Actividad biológica" del NGF generalmente se refiere a la capacidad para unirse a receptores NGF y/o activar las vías de señalización del receptor NGF. Sin limitación, una actividad biológica incluye una cualquiera o más de las siguientes: la capacidad para unirse a un receptor NGF (tal como p75 y/o TrkA); la capacidad para promover la dimerización y/o la autofosforilación del receptor TrkA; la capacidad para activar una vía de señalización del receptor NGF; la capacidad para promover la diferenciación, proliferación, supervivencia, crecimiento celular y otros cambios en la fisiología celular, que incluye (en el caso de neuronas, incluyendo neuronas centrales y periféricas) un cambio
15 en la morfología neuronal, sinaptogénesis, función sináptica, liberación de neurotransmisores y/o neuropéptidos y regeneración neuronal después de un daño; y la capacidad para mediar en el dolor.

El término "epítipo" se usa para referirse a sitios de unión para anticuerpos (monoclonales o policlonales) sobre antígenos de proteínas.

20 Como se usa en el presente documento, "tratamiento" es una aproximación para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de esta divulgación, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: mejora o alivio de cualquier aspecto del dolor, incluyendo dolor agudo, crónico, inflamatorio, neuropático, o postquirúrgico. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: reducción de la gravedad, alivio de uno o más síntomas asociados al dolor, incluyendo cualquier aspecto del dolor (tal como
25 acortamiento de la duración del dolor, y/o reducción de la sensibilidad o sensación de dolor).

La "reducción de la incidencia" del dolor significa cualquiera de la 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 usados generalmente para estas dolencias), duración, y/o frecuencia (incluyendo, por ejemplo, el retraso o el incremento del tiempo hasta la aparición del dolor en un individuo). Como es sabido por aquellos 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 del dolor en un individuo" refleja la administración del antagonista del NGF descrito en el presente documento en combinación con un analgésico opiáceo como se describe en el presente documento, basándose en unas expectativas razonables de que tal administración probablemente pueda provocar esa reducción en la incidencia en ese individuo particular.

35 "Mejora" del dolor o de uno o más síntomas de dolor significa una reducción o mejora de uno o más síntomas de un dolor comparado con la no administración de un antagonista del NGF en combinación con un analgésico opiáceo. "Mejora" también incluye el acortamiento o la reducción en la duración de un síntoma.

"Paliación" del dolor o de uno o más síntomas de dolor significa la reducción del grado de una o más manifestaciones clínicas de dolor no deseables en un individuo o en una población de individuos tratados con un antagonista del NGF en combinación con un analgésico opiáceo de acuerdo con la invención.

40 Como se usa en el presente documento, "retrasar" el desarrollo del dolor significa aplazar, dificultar, atrasar, retardar, estabilizar, y/o posponer la progresión del dolor. Este retraso puede ser de longitudes variables de tiempo, dependiendo del historial de la enfermedad y/o de los individuos tratados. Como es evidente para alguien experto en la técnica, un retraso suficiente o significativo puede, en efecto, englobar la prevención, en la que el individuo no desarrolla dolor. Un procedimiento que "retrasa" el desarrollo de los síntomas es un procedimiento que reduce la probabilidad de desarrollar los síntomas en un marco temporal dado y/o reduce el grado de los síntomas en un marco temporal dado, cuando se compara con el no uso del procedimiento. Tales comparaciones normalmente se basan en estudios clínicos, usando un número de sujetos estadísticamente significativo.

50 "Desarrollo" o "progresión" del dolor significa manifestaciones iniciales y/o la progresión resultante del trastorno. El desarrollo del dolor puede ser detectable y se puede valorar usando técnicas clínicas habituales muy conocidas en la técnica. No obstante, el desarrollo también se refiere a una progresión que puede ser indetectable. Para los propósitos de esta invención, el desarrollo o la progresión se refiere a la evolución biológica de los síntomas. "Desarrollo" incluye aparición, recurrencia, y comienzo. Como se usa en el presente documento, "comienzo" o "aparición" del dolor incluye comienzo y/o aparición iniciales.

55 Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para llevar a cabo los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyendo el alivio o la reducción en la sensación de dolor. Para los propósitos de esta divulgación, una cantidad eficaz de un antagonista del NGF y un opiáceo incluye una cantidad suficiente para tratar, mejorar, reducir la

intensidad, o prevenir el dolor (incluyendo nocicepción y la sensación de dolor) de cualquier tipo, incluyendo dolor agudo, crónico, inflamatorio, neuropático, o postquirúrgico. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz de un analgésico opiáceo y de un antagonista del NGF es una cantidad del antagonista del NGF y del analgésico opiáceo capaz de modular el umbral de sensibilidad a estímulos externos a un nivel comparable al observado en sujetos sanos.

En otras realizaciones, este nivel puede no ser comparable a aquel observado en sujetos sanos, pero está reducido comparado con los que no reciben la terapia de combinación. Una cantidad eficaz de un antagonista del NGF también engloba una cantidad de un antagonista del NGF suficiente para mejorar el tratamiento (efecto terapéutico) del dolor con el opiáceo, como se describe en el presente documento, o para reducir la dosis de opiáceo necesaria para el tratamiento o la prevención del dolor, como se describe en el presente documento. Como es sabido en la técnica, una cantidad eficaz de un antagonista del NGF en combinación con un opiáceo puede variar, dependiendo de, entre otros, el tipo de dolor (y el historial del paciente) así como de otros factores tales como el tipo (y/o la dosificación) o el antagonista del NGF y/o el opiáceo usado. Una cantidad eficaz, en el contexto de esta invención, también pueden ser cantidades de un antagonista del NGF y de un antagonista del opiáceo tal que se consigue un efecto sinérgico. Una cantidad eficaz de un antagonista en el contexto de esta invención generalmente significa una cantidad suficiente para conseguir una mejora del efecto terapéutico de un opiáceo para el dolor (que puede, a su vez, significar que se reduce la dosificación y/o se observa algún otro efecto beneficioso) y/o que da como resultado un efecto beneficioso comparado con el tratamiento con el opiáceo solo. Una "cantidad eficaz" de un antagonista del NGF también puede dar como resultado un efecto sinérgico comparado con la administración de un antagonista del NGF o del opiáceo solo. En algunas realizaciones, una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para retrasar el desarrollo del dolor.

Un "individuo" es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un humano. Los mamíferos incluyen, pero no están limitados a, animales de granja, animales de deporte, simios, caballos, vacas, perros, gatos, ratones y ratas.

La expresión "analgésico opiáceo" se refiere a todos los fármacos, naturales o sintéticos, con acciones similares a la morfina. Los analgésicos opiáceos sintéticos y semisintéticos son derivados de cinco clases de compuestos químicos: fenantrenos; fenilheptilaminas; fenilpiperidinas; morfinaos; y benzomorfanos, todos los cuales están dentro del alcance de la expresión. Analgésicos opiáceos ejemplares incluyen codeína, dihidrocodeína, diacetilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, levorfanol, oximorfona, alfentanilo, buprenorfina, butorfanol, fentanilo, sufentanilo, meperidina, metadona, nalbufina, propoxifeno y pentazocina y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Como se usa en el presente documento, la administración "en combinación" incluye la administración simultánea y/o la administración en momentos diferentes. La administración en combinación también engloba la administración en forma de co-formulación (es decir, el antagonista del NGF y el opiáceo están presentes en la misma composición) o la administración en forma de composiciones separadas. Como se usa en el presente documento, administración en combinación se pretende que englobe cualquier circunstancia en la que un opiáceo y un antagonista del NGF se administren a un individuo, que puede ocurrir simultáneamente y/o por separado. Como se describe posteriormente en el presente documento, se entiende que el antagonista del NGF y el opiáceo se pueden administrar a frecuencias o en intervalos de dosificación diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF se puede administrar semanalmente, mientras que un opiáceo se puede administrar más frecuentemente. Se entiende que el antagonista del NGF y el analgésico opiáceo se pueden administrar usando la misma vía de administración o vías de administración diferentes.

"Dolor postquirúrgico" (denominado de manera intercambiable "dolor postincisional") se refiere al dolor que surge o resulta de todos los procedimientos quirúrgicos, sean invasivos o no invasivos. Como se usa en el presente documento, dolor postquirúrgico no incluye el dolor que se produce (surge o se origina) sin un traumatismo físico externo. En algunas realizaciones, el dolor postquirúrgico es dolor interno o externo (incluyendo dolor periférico), y la herida, corte, traumatismo, desgarro o incisión se puede producir deliberadamente (como con una incisión quirúrgica). Como se usa en el presente documento, "dolor" incluye nocicepción y la sensación de dolor, y el dolor se puede valorar objetiva y subjetivamente, usando puntuación del dolor y otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Dolor postquirúrgico, como se usa en el presente documento, incluye alodinia (es decir, respuesta incrementada a un estímulo normalmente no nocivo) e hiperalgesia (es decir, respuesta incrementada a un estímulo normalmente nocivo o desagradable), que a su vez, puede ser de naturaleza térmica o mecánica (táctil). En algunas realizaciones, el dolor se caracteriza por sensibilidad térmica, sensibilidad mecánica y/o dolor en reposo. En algunas realizaciones, el dolor postquirúrgico comprende dolor inducido mecánicamente o dolor en reposo. En otras realizaciones, el dolor postquirúrgico comprende dolor en reposo. El dolor puede ser dolor primario o secundario, como es bien sabido en la técnica.

El tratamiento del dolor con opiáceos se "mejora" cuando se mejora un aspecto del tratamiento con opiáceos (comparado con la administración de opiáceos y la administración de un antagonista del NGF). Por ejemplo, la eficacia del tratamiento del dolor con opiáceos se puede incrementar en presencia de un antagonista del NGF en relación a la eficacia de un analgésico opiáceo en ausencia de un antagonista del NGF. Como un ejemplo más, el tratamiento o la prevención del dolor con un opiáceo se puede "mejorar" mediante el uso de un antagonista del NGF en combinación con un analgésico opiáceo cuando ese uso permite un mejor alivio del dolor (por ejemplo, cuando se usa una dosis de opiáceo que no permite el tratamiento o la prevención eficaz del dolor).

Usos médicos de la invención

Con respecto a todos los usos descritos en el presente documento, la referencia a un antagonista del NGF y a analgésicos opiáceos también incluye composiciones que comprenden uno o más de estos agentes. La presente invención es útil para el tratamiento del dolor postquirúrgico en individuos, incluyendo todos los mamíferos, tanto humanos como no humanos.

5 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF y un analgésico opiáceo para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico en un individuo. En algunas realizaciones, se administrará suficiente anticuerpo anti-NGF para así permitir la reducción de la dosis normal del analgésico opiáceo necesaria para lograr el mismo grado de mejora del dolor en al menos un 5% aproximadamente, al menos un 10% aproximadamente, al menos un 20% aproximadamente, al menos un 30% aproximadamente, al menos un 50% aproximadamente, al menos un 60% aproximadamente, al menos un 70% aproximadamente, al menos un 80% aproximadamente, o al menos un 90% aproximadamente, o superior.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un tratamiento analgésico opioide del dolor en un individuo que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF junto con una cantidad eficaz de un analgésico opioide.

15 En algunos aspectos, dolor comprende uno cualquiera o más de los siguientes: dolor agudo y/o crónico, cualquier dolor con un componente inflamatorio, dolor postquirúrgico, dolor posoperatorio (incluyendo dolor dental), migraña, dolor de cabeza y neuralgia trigeminal, dolor asociado a quemaduras, heridas o cálculos renales, dolor asociado a traumatismos (incluyendo traumatismos craneoencefálicos), dolor neuropático, y dolor asociado a cáncer (incluyendo "dolor irruptivo" y dolor asociado a cáncer terminal). En otros aspectos, el dolor es cualquier dolor que normalmente se trata con un analgésico opiáceo (tal como morfina), por ejemplo, pancreatitis, cálculo renal, dolor de cabeza, dismenorrea, dolor músculo-esquelético (por ejemplo, dolor lumbar), esguince, dolor visceral, quistes en los ovarios, prostatitis, cistitis, quemaduras químicas o térmicas, cáncer (tal como cáncer de próstata metastatizado hasta el hueso, cáncer de mama que ha metastatizado hasta el hueso, cáncer de pulmón que ha metastatizado hasta hueso, cáncer pancreático).

25 En otro aspecto, la divulgación proporciona la prevención, mejora y/o prevención del desarrollo o progresión del dolor. Así, en algunas realizaciones, el antagonista del NGF, tal como un anticuerpo anti-NGF, y/o el analgésico opiáceo se administran antes de un evento doloroso (tal como cirugía). Por ejemplo, el antagonista del NGF se puede administrar 30 minutos, una hora, 5 horas, 10 horas, 15 horas, 24 horas o incluso superior, tal como 1 día, varios días, o incluso una semana, 2 semanas, 3 semanas o más antes de la actividad que probablemente dé como resultado, o con riesgo de causar, dolor (tal como traumatismo externo o una operación).

30 El tratamiento o la prevención del dolor se valora usando procedimientos muy conocidos en la técnica. La valoración se puede realizar basándose en mediciones objetivas, tales como la observación de comportamientos como la reacción a los estímulos, expresiones faciales y similares. La valoración también puede estar basada en mediciones subjetivas, tales como la caracterización del dolor por parte 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): 35 239-55.

Se entiende que cuando un anticuerpo anti-NGF y un analgésico opiáceo se administran en combinación, ya sea en forma de composición única o como composiciones separadas, el antagonista del factor de crecimiento nervioso y el analgésico opiáceo están presentes en una relación que es consistente con la manifestación del efecto deseado. En algunas realizaciones, la relación ponderal del antagonista del factor de crecimiento nervioso al analgésico opiáceo puede ser de 1 a 1 aproximadamente. En algunas realizaciones, esta relación puede estar entre 0,001 aproximadamente a 1 aproximadamente y 1000 aproximadamente a 1 aproximadamente, o entre 0,01 aproximadamente a 1 aproximadamente y 100 aproximadamente a 1 aproximadamente. También están contempladas otras relaciones.

45 Se apreciará que la cantidad de un anticuerpo anti-NGF y un analgésico opiáceo necesario para su uso en el tratamiento o la prevención del dolor variará no solo con los compuestos o composiciones particulares seleccionados, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la dolencia a tratar, y la edad y estado del paciente, y en último caso, será a discreción del facultativo tratante.

Antagonistas del NGF

50 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-NGF como antagonistas del NGF. En el presente documento también se describen otros antagonistas del NGF, que se refieren a cualquier molécula que bloquee, suprima o reduzca (incluyendo significativamente) la actividad biológica del NGF, incluyendo las vías aguas abajo mediadas por la señalización del NGF, tales como la unión del receptor y/o la estimulación de una respuesta celular al NGF. El término "antagonista" implica un mecanismo no específico de cualquier acción biológica, y se considera para incluir y englobar expresamente todas las posibles interacciones farmacológicas, fisiológicas, y bioquímicas con el NGF y sus consecuencias que se pueden conseguir con una variedad de composiciones diferentes, y químicamente divergentes. 55 Antagonistas del NGF ejemplares incluyen, pero no están limitados a, un anticuerpo anti-NGF, una molécula antisentido dirigida a un NGF (incluyendo una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica para el NGF), una molécula antisentido dirigida a un receptor NGF (tal como un receptor TrkA y/o un receptor p75) (incluyendo

una molécula antisentido dirigida a un ácido nucleico que codifica para TrkA y/o p75), un compuesto inhibitorio del NGF, un análogo estructural del NGF, una mutación negativa dominante de un receptor TrkA que se une a un NGF, una inmunoadhesina TrkA, un anticuerpo anti-TrkA, un anticuerpo anti-p75, y un inhibidor de quinasa. Para los propósitos de la presente divulgación, se entenderá explícitamente que el término "antagonista" engloba todos los términos, títulos, y estados y características funcionales identificados previamente por lo que el propio NGF, una actividad biológica del NGF (incluyendo, pero no limitado a, su capacidad para mediar en cualquier aspecto del dolor), o las consecuencias de la actividad biológica, son sustancialmente anulados, reducidos, o neutralizados en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un antagonista del NGF (por ejemplo, un anticuerpo) se une (interacciona físicamente con) al NGF, o en algunos aspectos, se une a un receptor NGF (tal como el receptor TrkA y/o el receptor p75), y/o reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor NGF aguas abajo. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un antagonista del NGF se une (interacciona físicamente con) al NGF. En otro aspecto, un antagonista del NGF se une a un receptor NGF (tal como el receptor TrkA o p75). En otros aspectos, un antagonista del NGF reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor NGF aguas abajo (por ejemplo, señalización de los inhibidores de quinasa). En otros aspectos, un antagonista del NGF inhibe (reduce) la síntesis y/o liberación de NGF. En otro aspecto, el antagonista del NGF es una inmunoadhesina TrkA. En otro aspecto, el antagonista del NGF es distinto de un anticuerpo anti-NGF. En alguna realización, el antagonista del NGF se une al NGF (tal como hNGF) y no se une significativamente a neurotrofinas relacionadas, tales como la NT-3, NT 4/5, y/o BDNF. En otras realizaciones, el antagonista del NGF es un anticuerpo anti-NGF. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF está humanizado (tal como el 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 del anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o, en algunas realizaciones, las seis CDR de E3). En otras realizaciones, el anticuerpo es humano. En otras realizaciones más, el anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en la Tabla 1 (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en la Tabla 2 (SEQ ID NO: 2). En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, no desencadena la lisis mediada por el complemento, o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624; Solicitud PCT N.º WO9958572

Anticuerpos anti-NGF

En la presente invención, el antagonista del NGF comprende un anticuerpo anti-NGF. Un anticuerpo anti-NGF debe presentar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unirse al NGF; (b) inhibir la actividad biológica del NGF o las vías aguas abajo mediadas por la función de señalización del NGF; (c) tratar o prevenir cualquier aspecto del dolor, particularmente en combinación con un analgésico opiáceo; (d) bloquear o reducir la activación del receptor NGF (incluyendo la dimerización y/o autofosforilación del receptor TrkA); (e) incrementar el aclaramiento del NGF; (f) inhibir (reducir) la síntesis, producción o liberación del NGF; (g) mejorar el tratamiento del dolor con opiáceos.

Los anticuerpos anti-NGF son conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, los documentos Publicación PCT N° WO 01/78698, WO 01/64247, patentes de EE.UU. N° 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); GenBank N° de acceso U39608, U39609, L17078, o L17077.

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

Tabla 1: Región variable de la cadena pesada

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKG
LEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
GGYWYATSYFYFDYWGQGTLVTVS(SEQ ID NO:1).

Tabla 2: Región variable de la cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISINNLNWYQQKPGKAP
KLLIYYTSRFSVPSRFSVSGSGSDFTFTISLQPEDATYYCQQEHTLPYTFG
QGKLEIKRT(SEQ ID NO:2).

Los siguientes polinucleótidos que codifican la región variable de la cadena pesada de E3 o la región variable de la

cadena ligera de E3 se depositaron en la ATCC el 8 de enero de 2003:

Material		Nº acceso ATCC	Fecha de depósito
Vector Eb.911.3E	Región V de la cadena ligera de E3	PTA-4893	8 Enero, 2003
Vector Eb.pur.911.3E	Región V de la cadena ligera de E3	PTA-4894	8 Enero, 2003
Vector Db.911.3E	Región V de la cadena pesada de E3	PTA-4895	8 Enero, 2003

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

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

Los anticuerpos útiles en la presente invención pueden englobar anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos heteroconjugados, de cadena sencilla (ScFv), sus mutantes, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno de la especificidad necesaria, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos, y anticuerpos modificados covalentemente. Los anticuerpos pueden ser murinos, de rata, humanos, o de cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados). Para los propósitos de esta invención, el anticuerpo reacciona con el NGF de una manera que inhibe al NGF y/o las vías aguas abajo mediadas por la función de señalización del NGF. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano que reconoce uno o más epítopos sobre el NGF humano. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón o de rata que reconoce uno o más epítopos sobre el NGF humano. En otra realización, el anticuerpo reconoce uno o más epítopos sobre un NGF seleccionado del 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 el complemento, o no estimula la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). La actividad ADCC se puede valorar usando los procedimientos descritos en la patente de EE.UU. N° 5.500.362. En otras realizaciones, la región constante se modifica como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624; Publicación PCT N.º WO9958572.

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

Un modo de determinar la afinidad de unión de los anticuerpos al NGF es midiendo la afinidad de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) se puede escindir con papaína o se puede expresar de manera recombinante. La afinidad de un fragmento Fab de un anticuerpo anti-NGF se puede determinar mediante resonancia de plasmón superficial (sistema BIAcore3000™ de resonancia de plasmón superficial (SPR), BIAcore, INC, Piscaway NJ). Los chips CM5 chips se pueden activar con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del fabricante. El NGF humano se puede diluir en acetato sódico 10 mM a pH 4,0 y se puede inyectar

sobre el chip activado a una concentración de 0,005 mg/ml. Usando tiempos de flujo variables a lo largo de los canales individuales del chip, se pueden conseguir dos rangos de densidad de antígeno: 100-200 unidades de respuesta (RU) para estudios cinéticos detallados y 500-600 RU para ensayos de selección. El chip se puede bloquear con etanolamina. Los estudios de regeneración han demostrado que una mezcla de tampón de elución Pierce (Producto N° 21004, Pierce Biotechnology, Rockford IL) y NaCl 4 M (2:1) elimina eficazmente la Fab mientras mantiene la actividad del hNGF sobre el chip durante unas 200 inyecciones. Se usa tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, 0,005% de tensioactivo P29) como tampón de carrera para los ensayos con BIAcore. Se inyectan diluciones seriadas (0,1-10x K_D estimada) de muestras purificadas de Fab durante 1 minuto a 100 μ l/min y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 horas. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan mediante ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE usando una Fab de concentración conocida (determinada mediante análisis de aminoácidos) como patrón. Se obtienen simultáneamente las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) cinéticas ajustando los datos a un modelo de unión Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). *Methods Enzymology* 6: 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de disociación en equilibrio (K_D) se pueden calcular como k_{off}/k_{on} . Este protocolo es adecuado para su uso en la determinación de la afinidad de unión de un anticuerpo al NGF de cualquier especie, incluyendo el NGF humano, NGF de otro vertebrado (en algunas realizaciones, un mamífero) (tal como NGF de ratón, NGF de rata, NGF de primates), así como para su uso con otras neurotrofinas, tales como las neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5, y/o BDNF.

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

El epítipo (o epítipos) puede ser continuo o discontinuo. En una realización, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo del hNGF que un anticuerpo seleccionado del 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 del hNGF que MAb 911. En 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 los 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; residuo R103 entre la región variable 5 (aminoácidos 94-98) de hNGF y el C-término (aminoácidos 111-118) de hNGF; residuo E11 dentro de la región pre-variable 1 (aminoácidos 10-23) de hNGF; Y52 entre la región variable 2 (aminoácidos 40-49) de hNGF y la región variable 3 (aminoácidos 59-66) de hNGF; restos L112 y S113 dentro del C-término de hNGF; restos R59 y R69 dentro de la región variable 3 de hNGF; o restos V18, V20, y G23 dentro de la región pre-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 N-término, y/o el C-término de hNGF. En otra realización más, el anticuerpo reduce significativamente la accesibilidad al disolvente del residuo R103 de hNGF. Se entiende que aunque los epítipos descritos anteriormente se refieren al NGF humano, alguien con conocimientos ordinarios puede alinear las estructuras del NGF humano con el NGF de otras especies e identificar homólogos probables de estos epítipos.

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

Los anticuerpos anti-NGF se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. La vía y el calendario de inmunización del animal hospedador generalmente se mantienen con las técnicas establecidas y convencionales para la estimulación y producción de anticuerpos, como se describe posteriormente en el presente documento. Las técnicas generales para la producción de anticuerpos humanos y de ratón son conocidas en la técnica y se describen en el presente documento.

Se contempla que cualquier sujeto mamífero, incluyendo humanos o células procedentes de humanos que producen anticuerpos, se puede manipular para servir como base para la producción de líneas celulares de hibridoma de mamífero, incluyendo humanos. Normalmente, el animal hospedador es inoculado por vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar y/o intradérmica con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como se describe en el presente documento.

Los hibridomas se pueden preparar a partir de linfocitos y células de mieloma inmortalizadas usando la técnica de hibridación de células somáticas general de Kohler, B. y Milstein, C. (1975) *Nature* 256: 495-497 o la modificación de Buck, D. W., y col., *In vitro*, 18: 377-381 (1982). Las líneas de mieloma disponibles, incluyen, pero no están limitadas a X63-Ag8.653 y se pueden usar en la hibridación aquéllas del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA. En general, la técnica supone la fusión de células de mieloma y células linfoides usando un fusógeno tal

como polietilenglicol, o por medios eléctricos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se crecen en un medio de crecimiento selectivo, tal como medio hipoxantina-aminoptero-timidina (HAT), para eliminar las células parentales no hibridadas. Se puede usar cualquiera de los medios descritos en el presente documento, suplementados con o sin suero, para el cultivo de hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales. Como alternativa a técnica de fusión celular, se pueden utilizar células B inmortalizadas con EBV para producir los anticuerpos monoclonales anti-NGF de la presente invención. Los hibridomas se expanden y se subclonan, si se desea, y los sobrenadantes se someten a ensayo para la actividad anti-inmunógena mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático, o inmunoensayo de fluorescencia).

Los hibridomas que se pueden usar como fuente de anticuerpos engloban todas las células de la progenie derivadas de los hibridomas parentales que producen anticuerpos monoclonales específicos para el NGF, o una fracción de los mismos.

Los hibridomas que producen tales anticuerpos se pueden crecer *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar a partir del medio de cultivo o de fluidos corporales, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como precipitación con 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, pasando la preparación por adsorbentes hechos del inmunógeno unido a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal hospedador con un NGF humano, o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugada a una proteína que es inmunógena en la especie a inmunizar como por ejemplo, hemocianina de *Keyhole limpet*, seroalbúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzil sulfosuccinimida (conjugación a través de los restos cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de los restos lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl₂, o R1N=C=NR, en la que R y R1 son diferentes grupos alquilo, puede producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).

Si se desea, el anticuerpo anti-NGF (monoclonal o policlonal) de interés se puede secuenciar y la secuencia de polinucleótidos a continuación se puede clonar en un vector para su expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés se puede mantener en un vector en una célula hospedadora y la célula hospedadora a continuación se puede expandir y congelar para su uso futuro. En una alternativa, la secuencia de polinucleótidos se puede usar por manipulación genética para "humanizar" el anticuerpo o mejorar la afinidad, u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante se puede hibridar por ingeniería genética a regiones constantes humanas más parecidas para evitar la respuesta inmunitaria, si el anticuerpo se usa en ensayos clínicos y tratamientos en humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia del anticuerpo para obtener una mayor afinidad al NGF y una mayor eficacia en la inhibición del NGF. Será evidente para alguien experto en la técnica que se pueden realizar uno o más cambios de polinucleótidos en el anticuerpo anti-NGF y aun así mantener su capacidad de unión al NGF.

Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Éstas son: (1) determinar el nucleótido y predecir la secuencia de aminoácidos de los dominios variables ligero y pesado del anticuerpo de partida, (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región del entramado del anticuerpo usar durante el proceso de humanización, (3) las metodologías/técnicas de humanización en sí y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véanse, por ejemplo, patentes de EE.UU. N° 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

Se han descrito una serie de moléculas de anticuerpo "humanizadas" que comprenden un sitio de unión del antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos con regiones V de roedor o de roedor modificadas y sus regiones determinantes de complementariedad (CDR) asociadas fusionadas a dominios constantes humanos. Véase, por ejemplo, Winter y col. *Nature* 349: 293-299 (1991), Lobuglio y col. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 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 roedor injertadas en una región de entramado (FR) de soporte humana antes de fusionarse con un dominio constante de un anticuerpo humano apropiado. Véase, por ejemplo, Riechmann y col. *Nature* 332: 323-327 (1988), Verhoeyen y col. *Science* 239: 1534-1536 (1988), y Jones y col. *Nature* 321: 522-525 (1986). Otra referencia describe CDR de roedor soportadas por regiones de entramado de roedor hibridadas por recombinación. Véase, por ejemplo, Publicación de patente europea N° 519.596. Estas moléculas "humanizadas" están diseñadas para minimizar una respuesta inmunológica no deseada contra las moléculas de anticuerpo anti-humano de roedor que limita la duración y eficacia de las aplicaciones terapéuticas de estos restos en receptores humanos. 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 las patentes de EE.UU. N° 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; 6.350.861; y Publicación PCT N° WO 01/27160.

En otra alternativa más, se pueden obtener anticuerpos completamente humanos usando ratones disponibles comercialmente que han sido tratados por ingeniería genética para expresar proteínas inmunoglobulinas humanas específicas. También se pueden usar animales transgénicos que están diseñados para producir una respuesta inmunitaria más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o más robusta para la generación de anticuerpos humanos o humanizados. Ejemplos de esa tecnología son Xenomouse™ de Abgenix, Inc. (Fremont, CA)

y HuMAb-Mouse® y TC Mouse™ de Medarex, Inc. (Princeton, NJ).

Es evidente que aunque la descripción anterior pertenece a anticuerpos humanizados, los principios generales descritos son aplicables a la adaptación de anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos. También es evidente que se pueden combinar uno o más aspectos de la humanización de un anticuerpo descritos en el presente documento, por ejemplo, injerto de CDR, mutación del entramado y mutación de CDR.

En una alternativa, los anticuerpos se pueden preparar de manera recombinante y se pueden expresar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. En otra alternativa, los anticuerpos se pueden preparar de manera recombinante mediante tecnología de presentación de fagos. Véanse, por ejemplo, patentes de EE.UU. N° 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; 6.265.150; y Winter y col., *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455 (1994). Alternativamente, la tecnología de presentación de fagos (McCafferty y col., *Nature* 348: 552-553 (1990)) se puede usar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulinas procedentes de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en el marco de lectura en un gen de una proteína de cubierta principal o secundaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o Fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma del fago, las elecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Así, el fago mimetiza alguna de las propiedades de la célula B. La presentación del fago se puede realizar en una variedad de formatos; para una revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación de fagos. Clackson y col., *Nature* 352: 624-628 (1991) aislaron una colección diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña librería combinatoria aleatoria de genes V procedentes de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y los anticuerpos para una colección diversa de antígenos (incluyendo autos-antígenos) se pueden aislar 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 inmunitaria natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una tasa elevada (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una mayor afinidad, y las células B que presentan inmunoglobulinas de superficie de alta afinidad preferentemente se replican y se diferencian durante la posterior exposición al antígeno. Este proceso natural se puede mimetizar empleando la técnica conocida como "barajado de la cadena" Marks, y col., *Bio/Technol.* 10: 779-783 (1992)). En este procedimiento, la afinidad de los anticuerpos humanos "primarios" obtenidos mediante presentación de fagos se puede mejorar sustituyendo secuencialmente los genes de la región V de la cadena pesada y ligera con repertorios de variantes de origen natural de 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 de pM-nM. Una estrategia para preparar repertorios de anticuerpos de fagos muy grandes (también conocida como "la madre de todas las librerías") ha sido descrita por Waterhouse y col., *Nucl. Acids Res.* 21: 2265-2266 (1993). El barajado de genes también se puede usar para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos de roedor, en los que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. Según este procedimiento, que también se denomina "impronta del epítipo", el gen del dominio V de la cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedor obtenidos mediante la técnica de presentación de fagos es sustituido con un repertorio de genes del dominio V humano, creando quimeras roedor-humano. La selección sobre el antígeno da como resultado el aislamiento de las regiones variables humanas capaces de restaurar un sitio funcional de unión al antígeno, es decir, el epítipo gobierna (imprime) la elección del compañero. Cuando el proceso se repite para reemplazar el dominio V de roedor restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase, Solicitud de patente PCT WO 9306213, 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 del entramado o CDR de origen murino. Es evidente que aunque la descripción anterior pertenece a anticuerpos humanizados, los principios generales descritos son aplicables a la personalización de anticuerpos para su uso, por ejemplo, en perros, gatos, primates, equinos y bovinos.

Los anticuerpos se pueden preparar de manera recombinante aislando primero los anticuerpos y las células que producen anticuerpos de los animales hospedadores, obteniendo la secuencia de genes, y usando la secuencia de genes para expresar el anticuerpo de manera recombinante en células hospedadoras (por ejemplo, células CHO). Otro procedimiento que se puede emplear es expresar la secuencia del anticuerpo en plantas (por ejemplo, tabaco) o leche transgénica. Ya han sido descritos los procedimientos para la expresión anticuerpos de manera recombinante en plantas o leche. Véase, por ejemplo, Peeters, y col. *Vaccine* 19: 2756 (2001); Lonberg, N. y D. Huszar *Int. Rev. Immunol* 13: 65 (1995); y Pollock, y col., *J Immunol Methods* 231: 147 (1999). Los procedimientos para la preparación de derivados de anticuerpos, por ejemplo, humanizados, de cadena sencilla, etc., son conocidos en la técnica.

También se pueden emplear inmunoensayos y técnicas de clasificación de citometría de flujo tales como clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para aislar anticuerpos que son específicos para el NGF.

Los anticuerpos se pueden unir a muchos portadores diferentes. Los portadores pueden ser activos y/o inertes. Ejemplos de portadores bien conocidos incluyen polipropileno, poliestireno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, vidrio, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del portador puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Aquellos expertos en la técnica reconocerán otros portadores

adecuados para la unión de anticuerpos, o serán capaces de determinarlos, usando experimentación rutinaria.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de ese ADN. Una vez aislado, el ADN se puede introducir en vectores de expresión (tales como los factores de expresión descritos en el documento WO 87/04462), que a continuación se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera proteínas inmunoglobulinas, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Véase, por ejemplo, Publicación PCT N° WO 87/04462. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de la cadena ligera y pesada humana en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison y col., Proc. Nat. Acad. Sci. 81: 6851 (1984), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina. De esa manera, en el presente documento se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-NGF.

Los anticuerpos anti-NGF se pueden caracterizar usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento es identificar el epítipo al cual se unen, o "mapeo de epítipo". Hay muchos procedimientos conocidos en la técnica para el mapeo y la caracterización de la localización de epítopos en proteínas, incluyendo la resolución de la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos génicos, y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1999. En un ejemplo adicional, el mapeo del epítipo se puede usar para determinar la secuencia a la cual se une el anticuerpo anti-NGF. El mapeo del epítipo está disponible comercialmente en varias fuentes, por ejemplo, Pepscan Systems (Edelhertweg 15, 8219 PH Lelystad, Holanda). El epítipo puede ser un epítipo lineal, es decir, contenido en una sola extensión de aminoácidos, o un epítipo conformacional formado por una interacción tridimensional de aminoácidos que pueden no necesariamente estar contenidos en una única extensión. Se pueden aislar o sintetizar (por ejemplo, de manera recombinante) péptidos de longitudes variables (por ejemplo, al menos 4-6 aminoácidos de largo) y se pueden usar para ensayos de unión con un anticuerpo anti-NGF. En otro ejemplo, el epítipo al cual se une el anticuerpo anti-NGF se puede determinar en una selección sistemática usando el solapamiento de péptidos derivados de la secuencia NGF y determinando la unión mediante el anticuerpo anti-NGF. Según los ensayos de expresión de fragmentos génicos, el marco de lectura abierto que codifica el NGF se fragmenta aleatoriamente o mediante construcciones genéticas específicas y la reactividad de los fragmentos del NGF expresados se determina con el anticuerpo a probar. Los fragmentos génicos se pueden producir, por ejemplo, mediante PCR y a continuación se pueden transcribir y traducir en proteínas *in vitro*, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos del NGF marcados radiactivamente se determina a continuación por inmunoprecipitación y electroforesis en gel. Ciertos epítopos también se pueden identificar usando grandes librerías de secuencias de péptidos aleatorios presentados en la superficie de partículas de fago (librerías de fagos). Alternativamente, una librería definida de solapamiento de fragmentos peptídicos se puede probar para la unión al anticuerpo de prueba en simples ensayos de unión. En un ejemplo adicional, se puede realizar mutagénesis de un dominio de unión al antígeno, experimentos de intercambio de dominios y mutagénesis de barrido de alanina para identificar los restos requeridos, suficientes, y/o necesarios para la unión al epítipo. Por ejemplo, los experimentos de intercambio de dominios se pueden realizar usando un NGF mutante en el que diversos fragmentos del polipéptido NGF han sido sustituidos (intercambiados) con secuencias de una proteína íntimamente relacionada, pero antigénicamente distinta (tal como otro miembro de la familia de proteínas neurotrofina). Valorando la unión del anticuerpo al NGF mutante, se puede valorar la importancia del fragmento NGF particular para la unión al anticuerpo.

Otro procedimiento más que se puede usar para caracterizar un anticuerpo anti-NGF es usar ensayos de competición con otros anticuerpos conocidos por unirse al mismo antígeno, es decir, diversos fragmentos sobre el NGF, para determinar si el anticuerpo anti-NGF se une al mismo epítipo como los otros anticuerpos. Los ensayos de competición son muy conocidos por aquellos 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., *Hybridoma* 19: 215-227 (2000).

Otros antagonistas del NGF

También se describen otros antagonistas del NGF distintos de los anticuerpos anti-NGF. En algunos aspectos, el antagonista del NGF comprende al menos una molécula antisentido capaz de bloquear o reducir la expresión de un NGF funcional. Las secuencias de nucleótidos del NGF son conocidas y están fácilmente disponibles en bases de datos abiertas a consulta por el público. 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 rutinario preparar moléculas de oligonucleótidos antisentido que se unirán específicamente al ARNm del NGF sin reacción cruzada con otros polinucleótidos. Sitios diana ejemplares incluyen, pero no están limitados a, el codón de iniciación, las regiones reguladoras 5', la secuencia codificante y la región sin traducir 3'. En algunos aspectos, los oligonucleótidos tienen de 10 a 100 nucleótidos de longitud aproximadamente, de 15 a 50 nucleótidos de longitud aproximadamente, 18 a 25 nucleótidos de longitud aproximadamente, o superior. Los oligonucleótidos pueden comprender modificaciones estructurales tales como, por ejemplo, enlaces de fosforotioato, y modificaciones 2'-O-azúcar muy conocidas en la técnica. Moléculas antisentido

ejemplares incluyen las moléculas antisentido del NGF descritas en la Publicación de EE.UU. N° 20010046959; véase también <http://www.rna-tec.com/repair.htm>.

5 En otros aspectos, el antagonista del NGF comprende al menos una molécula antisentido capaz de bloquear o reducir la expresión de un receptor NGF funcional (tal 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 en bases de datos abiertas a consulta por el público.

10 Alternativamente, la expresión y/o liberación del NGF se puede reducir usando silenciamiento génico, oligonucleótidos morfolino, ARNi, o ribozimas, procedimientos que son muy conocidos en la técnica. Véase, <http://www.maclester.edu/~montgomery/RNAi.html>; <http://pub32.ezboard.com/fmorpholinosfrm19.showMessage?topicID=6.topic>; <http://www.highveld.com/ribozyme.html>.

15 En otros aspectos, el antagonista del NGF comprende al menos un compuesto inhibitorio del NGF. Como se usa en el presente documento, "compuesto inhibitorio del NGF" se refiere a un compuesto distinto del anticuerpo anti-NGF que reduce, inhibe, neutraliza, o anula directa o indirectamente la actividad biológica del NGF. Un compuesto inhibitorio del NGF debe presentar una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unirse al NGF; (b) inhibir la actividad biológica del NGF y/o las vías aguas abajo mediadas por la función de la señalización del NGF; (c) tratar o prevenir cualquier aspecto del dolor, particularmente en combinación con un analgésico opiáceo; (d) bloquear o reducir la activación del receptor NGF (incluyendo la dimerización y/o autofosforilación del receptor TrkA); (e) incrementar el aclaramiento del NGF; (f) inhibir (reducir) la síntesis, producción o liberación de NGF; (g) mejorar el tratamiento del dolor con opiáceos. Compuestos inhibitorios del NGF ejemplares incluyen las moléculas pequeñas inhibitorias del NGF descritas en la Publicación de EE.UU. N° 20010046959; los compuestos que inhiben la unión del NGF a p75, como se describe en la Publicación PCT N° WO 00/69829; los compuestos que inhiben la unión del NGF a TrkA/p75, como se describe en la Publicación PCT N° WO 98/17278. Ejemplos adicionales de compuestos inhibitorios del NGF incluyen los compuestos descritos en las Publicaciones PCT N° WO 02/17914, WO 02/20479, patentes de EE.UU. N° 5.342.942, 6.127.401, y 6.359.130. Compuestos inhibitorios del NGF ejemplares adicionales son los compuestos que son inhibidores competitivos del NGF. Véase patente de EE.UU. N° 6.291.247. Además, un experto en la técnica puede preparar otras moléculas pequeñas inhibitorias del NGF.

20 En algunos aspectos, un compuesto inhibitorio del NGF se une al NGF. Sitios diana (de unión) ejemplares incluyen, pero no están limitados a, la fracción del NGF que se une al receptor Trka y/o p75, y aquellas fracciones del NGF que son adyacentes a la región de unión del receptor y que son responsables, en parte, de la forma tridimensional correcta de la fracción de unión del receptor. En otra realización, un compuesto inhibitorio del NGF se une al receptor NGF (tal como Trka y/o p75) e inhibe una actividad biológica del NGF. Sitios diana ejemplares incluyen aquellas fracciones de Trka y/o p75 que se unen al NGF.

25 En aspectos que comprenden moléculas pequeñas, una molécula pequeña puede tener un peso molecular entre cualquiera de 100 y 20.000 Daltons, 500 y 15.000 Daltons, o 1000 y 10.000 Daltons aproximadamente. Están disponibles comercialmente librerías de moléculas pequeñas. Las moléculas pequeñas se pueden administrar usando cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo inhalación, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal, o dérmicamente. En algunos aspectos, cuando el antagonista del NGF es una molécula pequeña, se administrará a una tasa de 0,1 a 300 mg/kg de peso corporal del paciente dividido en una a tres o más dosis. Para un paciente adulto de peso normal, se pueden administrar dosis que abarcan entre 1 mg y 5 g por dosis.

30 En otros aspectos, el antagonista del NGF comprende al menos un análogo estructural del NGF. "Análogos estructurales del NGF" se refieren a compuestos que tienen una estructura tridimensional similar a una parte de la del NGF y que se unen a un receptor NGF en condiciones fisiológicas *in vitro* o *in vivo*. En un aspecto, el análogo estructural del NGF se une a un receptor TrkA y/o p75. Análogos estructurales del NGF ejemplares incluyen, pero no están limitados a, péptidos bicíclicos descritos en la Publicación PCT N° WO 97/15593; los péptidos bicíclicos descritos en la patente de EE.UU. N° 6.291.247; los compuestos cíclicos descritos en la patente de EE.UU. N° 6.017.878; y los péptidos derivados del NGF descritos en la Publicación PCT N° WO 89/09225. También se pueden diseñar y sintetizar análogos estructurales del NGF adecuados mediante modelización molecular de la unión NGF-receptor, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en la Publicación PCT N° WO 98/06048. Los análogos estructurales del NGF pueden ser monómeros o dímeros/oligómeros en cualquier combinación deseada de las mismas estructuras o diferentes para obtener afinidades y efectos biológicos mejorados.

35 En otros aspectos, el antagonista del NGF que comprende al menos un mutante dominante negativo del receptor TrkA y/o p75. Alguien experto en la técnica puede preparar mutantes dominantes negativos de, por ejemplo, el receptor TrkA tal que el receptor se unirá al NGF y, así, actuará como "sumidero" para capturar los NGF. No obstante, los mutantes dominantes negativos no tendrán la bioactividad normal del receptor (tal como el receptor TrkA) tras la unión al NGF. Mutantes dominantes negativos ejemplares incluyen, pero no están limitados a, los mutantes descritos en las siguientes referencias: Li y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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 proteínas o en forma de un vector de expresión tal que el mutante dominante negativo

(por ejemplo, un mutante del receptor TrkA) se exprese *in vivo*. La proteína o el vector de expresión se pueden administrar usando cualquier medio conocido en la técnica, tal como intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal, dérmicamente, o por inhalación. Por ejemplo, la administración de vectores de expresión incluye la administración local o sistémica, incluyendo inyección, administración por vía oral, administración con pistola de partículas o por catéter, y administración por vía tópica. Alguien experto en la técnica está familiarizado con la administración de vectores de expresión para obtener la expresión de una proteína exógena *in vivo*. Véase, por ejemplo, patentes de EE.UU. N° 6.436.908; 6.413.942; 6.376.471.

También se puede usar la administración dirigida de composiciones terapéuticas que contienen un polinucleótido antisentido, un vector de expresión, o polinucleótidos subgenómicos. Técnicas de administración de ADN mediadas por el 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 100 ng aproximadamente a 200 mg (o superior) de ADN aproximadamente para la administración local en un protocolo de terapia génica. En algunos aspectos, también se pueden usar intervalos de concentración inferiores a 500 ng aproximadamente, de 500 ng aproximadamente a 50 mg aproximadamente, de 1 µg aproximadamente a 2 mg aproximadamente, de 5 µg aproximadamente a 500 µg aproximadamente, y de 20 µg aproximadamente a 100 µg aproximadamente o superior de ADN durante un protocolo de terapia génica. Los polinucleótidos y polipéptidos terapéuticos de la presente divulgación se pueden administrar usando vehículos de administración de genes. El vehículo de administración de genes puede ser de origen vírico o no vírico (véase, en general, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1: 51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5: 845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1: 185; y Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6: 148). La expresión de estas secuencias codificantes se pueden inducir usando promotores y/o potenciadores endógenos de mamífero o heterólogos. La expresión de la secuencia codificante puede ser constitutiva o regulada.

En la técnica se conocen bien vectores basados en virus para la administración de un polinucleótido deseado y su expresión en una célula deseada. Vehículos basados en virus ejemplares incluyen, pero no están limitados a, retrovirus recombinantes (véase, por ejemplo, Publicación PCT N° WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; patentes de EE.UU. N° 5.219.740; 4.777.127; patente de GB N° 2.200.651; y patente EP N° 0 345 242), vectores basados en alfavirus (por ejemplo, vectores de virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532)), y vectores asociados a adenovirus (AAV) (véase, por ejemplo, Publicación PCT N° 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 unido a adenovirus muertos como se describe en Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147.

También se pueden emplear vehículos y procedimientos de administración no víricos, incluyendo, pero no limitado a, condensados policatiónicos de ADN unidos o no unidos a adenovirus solo (véase, por ejemplo, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147); ADN unido a ligando (véase, por ejemplo, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264: 16985); células vehículo para la administración en células eucariotas (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N° 5.814.482; Publicación PCT N° WO 95/07994; WO 96/17072; WO 95/30763; y WO 97/42338) neutralización o fusión de la carga nucleica con membranas celulares. También se puede emplear ADN desnudo. Procedimientos de introducción de ADN desnudo ejemplares se describen en la Publicación PCT N° WO 90/11092 y en la patente de EE.UU. N° 5.580.859. Los liposomas que pueden actuar como vehículos de administración de genes se describen en la patente de EE.UU. N° 5.422.120; Publicación PCT N° WO 95/13796; WO 94/23697; WO 91/14445; y patente EP N° 0 524 968. Aproximaciones adicionales se describen en Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14: 2411, y en Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91: 1581.

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

En otro aspecto, el antagonista del NGF comprende al menos una inmunoadhesina TrkA. Las inmunoadhesinas TrkA como se usan en el presente documento se refieren a moléculas quiméricas solubles que comprenden el dominio extracelular de un receptor TrkA (o una fracción del mismo) y una secuencia de inmunoglobulina, que retiene la especificidad de unión (en algunas realizaciones, retiene sustancialmente la especificidad de unión) del receptor TrkA y es capaz de unirse al NGF. Una inmunoadhesina TrkA es capaz de bloquear (reducir y/o suprimir) una actividad biológica del NGF, como se describe en el presente documento.

Las inmunoadhesinas TrkA son conocidas en la técnica, y se ha encontrado que bloquean (reducen o suprimen) la unión del NGF al receptor TrkA. Véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N° 6.153.189. En un aspecto, la inmunoadhesina TrkA comprende la fusión de una secuencia de aminoácidos del receptor TrkA capaz de unirse al NGF (o una secuencia de aminoácidos que retiene sustancialmente la especificidad de unión del receptor TrkA) y una secuencia de inmunoglobulina (o una secuencia de aminoácidos que retiene sustancialmente la especificidad de unión

al receptor TrkA). En algunos aspectos, el receptor TrkA es una secuencia de un receptor TrkA humano, y la fusión es con una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. En otros aspectos, la secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina es una secuencia del dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina. En otras realizaciones, la asociación de dos fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina-receptor TrkA (por ejemplo, a través del enlace covalente mediante puente disulfuro(s)) da como resultado una estructura homodimérica de tipo inmunoglobulina. Una cadena ligera de la inmunoglobulina además se puede asociar a una o ambas de las quimeras receptor TrkA-inmunoglobulina en el dímero con el puente disulfuro para dar una estructura homotrimérica u homotetramérica. Ejemplos de inmunoadhesinas TrkA adecuadas incluyen aquellas descritas en la patente de EE.UU. N° 6.153.189.

En otro aspecto, el antagonista del NGF comprende al menos un anticuerpo anti-TrkA capaz de bloquear, suprimir, alterar, y/o reducir la interacción física del NGF con el receptor TrkA y/o la señalización aguas abajo, por lo que se reduce y/o bloquea la actividad biológica del NGF. Los anticuerpos anti-TrkA son conocidos en la técnica. Anticuerpos anti-TrkA ejemplares incluyen aquellos descritos en la Publicación PCT N° WO 97/21732, WO 00/73344, WO 02/15924, y en la Publicación de EE.UU. N° 20010046959. En otro aspecto, el antagonista del NGF comprende al menos un anticuerpo anti-p75 capaz de bloquear, suprimir, y/o reducir la interacción física del NGF con el receptor p75 y/o la señalización aguas abajo, por lo que se reduce y/o bloquea la actividad biológica del NGF.

En otro aspecto, el antagonista del NGF comprende al menos un inhibidor de quinasa capaz de inhibir la señalización quinasa aguas abajo asociada a la actividad del receptor TrkA y/o p75. Un inhibidor de quinasa ejemplar es K252a o K252b, que es conocido 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 resumen y 12th Collective Chemical Substance Index, p. 34237, c. 3 (5-7), 55-60, 66-69), p. 34238, c. 1 (41-44), c. 2 (25-27, 32-33), p. 3423, c. 3 (48-50, 52-53); patente de EE.UU. N° 6.306.849.

Si el facultativo investiga se espera que sean identificadas una serie de otras categorías de antagonistas del NGF.

Identificación de los antagonistas del NGF

Los anticuerpos anti-NGF y otros antagonistas del NGF se pueden identificar o caracterizar usando procedimientos conocidos en la técnica, mediante los que se detecta y/o mide la reducción, mejora, o neutralización de una actividad biológica del NGF. Por ejemplo, se puede usar un ensayo de activación del receptor quinasa (KIRA) descrito en la patente de EE.UU. N° 5.766.863 y 5.891.650, para identificar antagonistas del NGF. Este ensayo de tipo ELISA es adecuado para la medida cualitativa o cuantitativa de la activación quinasa midiendo la autofosforilación del dominio quinasa de una proteína receptora tirosina quinasa (en lo sucesivo "rPTK"), por ejemplo, el receptor TrkA, así como para la identificación y caracterización de antagonistas potenciales de una rPTK, por ejemplo, TrkA. La primera fase del ensayo supone la fosforilación del dominio quinasa de un receptor quinasa, por ejemplo, un receptor TrkA, en el que el receptor está presente en la membrana celular de una célula eucariota. El receptor puede ser un receptor endógeno o un ácido nucleico que codifica el receptor, o una construcción del receptor, que se puede transformar en la célula. Normalmente, una primera fase sólida (por ejemplo, un pocillo de una primera placa de ensayo) se recubre con una población sustancialmente homogénea de tales células (normalmente una línea celular de mamífero) de manera que las células se adhieren a la fase sólida. A menudo, las células son adherentes y por tanto se adhieren naturalmente a la primera fase sólida. Si se usa una "construcción del receptor", normalmente comprende una fusión de un receptor quinasa y un polipéptido bandera. El polipéptido bandera es reconocido por el agente de captura, a menudo un anticuerpo de captura, en la parte ELISA del ensayo. A continuación se añade un analito, tal como un anticuerpo anti-NGF u otro antagonista del NGF candidato, junto con el NGF a los pocillos con las células adherentes, de manera que el receptor tirosina quinasa (por ejemplo, el receptor TrkA) se expone a (o se pone en contacto con) el NGF y el analito. Este ensayo permite la identificación de anticuerpos (u otro antagonista del NGF) que inhiban la activación de TrkA por su ligando NGF. Después de la exposición al NGF y al analito, las células adherentes se solubilizan usando un tampón de lisis (que contiene un detergente solubilizante) y agitación suave, liberando así el lisado celular que se puede someter directamente a la parte ELISA del ensayo, sin la necesidad de concentrar o clarificar el lisado celular.

El lisado celular así preparado está listo entonces para ser sometido a la fase ELISA del ensayo. Como una primera etapa en la fase ELISA, una segunda fase sólida (normalmente un pocillo de una placa de microtitulación de ELISA) se recubre con un agente de captura (a menudo un anticuerpo de captura) que se une específicamente al receptor tirosina quinasa, o, en el caso de una construcción del receptor, al polipéptido bandera. El recubrimiento de la segunda fase sólida se lleva a cabo de manera que el agente de captura se adhiera a la segunda fase sólida. El agente de captura generalmente es un anticuerpo monoclonal, pero, como se describe en los ejemplos del presente documento, también se pueden usar anticuerpos policlonales. El lisado celular obtenido a continuación se expone a, o se pone en contacto con, el agente de captura adherente de manera que el receptor o la construcción del receptor se adhiere a (o es capturado en) la segunda fase sólida. A continuación se lleva a cabo una etapa de lavado, para así eliminar el lisado celular no unido, dejando el receptor o la construcción del receptor capturado. El receptor o la construcción del receptor capturado o adherido a continuación se expone a, o se pone en contacto con, un anticuerpo anti-fosfotirosina que identifica los restos tirosina fosforilados en el receptor tirosina quinasa. En una realización, el anticuerpo anti-fosfotirosina está conjugado (directa o indirectamente) a una enzima que cataliza un cambio de color de un reactivo coloreado no radiactivo. Por consiguiente, la fosforilación del receptor se puede medir mediante un posterior cambio

de color del reactivo. La enzima puede estar unida directamente al anticuerpo anti-fosfotirosina, o una molécula de conjugación (por ejemplo, biotina) puede estar conjugada al anticuerpo anti-fosfotirosina y la enzima se puede unir posteriormente al anticuerpo anti-fosfotirosina a través de la molécula de conjugación. Finalmente, se mide la unión del anticuerpo anti-fosfotirosina al receptor o la construcción del receptor capturado, por ejemplo, mediante un cambio de color en el reactivo coloreado.

El antagonista del NGF también se puede identificar incubando un agente candidato con NGF y controlando una cualquiera o más de las siguientes características: (a) unión al NGF; (b) inhibición de la actividad biológica del NGF o de las vías aguas abajo mediadas por la función de señalización del NGF; (c) bloqueo o reducción de la activación del receptor NGF (incluyendo la dimerización y/o autofosforilación de TrkA); (d) incremento del aclaramiento del NGF; (e) tratamiento, mejora o prevención de cualquier aspecto del dolor, particularmente en combinación con un analgésico opiáceo; (f) inhibición (reducción) de la síntesis, producción o liberación del NGF; (g) mejora del tratamiento del dolor con opiáceos. En algunas realizaciones, un antagonista del NGF se identifica incubando un agente candidato con NGF y controlando la unión y la reducción o neutralización asistida de la actividad biológica del NGF. El ensayo de unión se puede realizar con polipéptidos de NGF purificados, o con células que expresan naturalmente, o transfectadas para expresar, polipéptidos de NGF. En una realización, el ensayo de unión es un ensayo de unión competitivo, en el que se evalúa la capacidad de un anticuerpo candidato para competir con un antagonista del NGF conocido por unirse al NGF. El ensayo se puede realizar en diversos formatos, incluyendo el formato ELISA. En otras realizaciones, se identifica un antagonista del NGF incubando un agente candidato con NGF y controlando la inhibición asistida de la dimerización y/o autofosforilación del receptor TrkA.

Después de la identificación inicial, la actividad de un antagonista anti-NGF candidato se puede confirmar y refinar posteriormente mediante bioensayos, conocidos por probar las actividades biológicas dirigidas. Alternativamente, se pueden usar bioensayos para seleccionar directamente los candidatos. Por ejemplo, el NGF promueve una serie de cambios morfológicamente reconocibles en células sensibles. Éstos incluyen, pero no están limitados a, promoción de la diferenciación de células PC12 y mejora del crecimiento de neuritas en estas células (Urfer y col., *Biochem* 36: 4775-4781 (1997); Tsoulfas y col., *Neuron* 10: 975-990 (1993)), promoción de la extensión de neuritas en explantes de ganglios sensoriales y simpáticos sensibles (Levi-Montalcini, R. y Angeletti, P. *Nerve growth factor. Physiol. Rev.* 48, 534-569, 1968) y promoción de la supervivencia de neuronas dependientes del NGF tales como neuronas del ganglio de la raíz dorsal embrionaria, del ganglio trigeminal, o el ganglio simpático (por ejemplo, Chun & Patterson, *Dev. Biol.* 75: 705-711, (1977); Buchman & Davies, *Development* 118: 989-1001, (1993)). Así, el ensayo para la inhibición de la actividad biológica del NGF supone el cultivo de células sensibles al NGF con NGF más un analito, tal como un anticuerpo anti-NGF candidato o un antagonista del NGF candidato. Después de un tiempo apropiado la respuesta celular se someterá a ensayo (diferenciación celular, extensión de neuritas o supervivencia celular).

La capacidad de un antagonista del NGF candidato para bloquear o neutralizar la actividad biológica del NGF también se puede valorar controlando la capacidad del agente candidato para inhibir la supervivencia mediada por el NGF en el bioensayo de supervivencia del ganglio de la raíz dorsal de rata embrionaria como se describe en Hongo y col., *Hybridoma* 19: 215-227 (2000).

Composiciones

Las composiciones para su uso en la invención, comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-NGF y/o un analgésico opiáceo, como se describe en las diversas realizaciones del presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos, la composición es para su uso en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento (tales como los procedimientos para el tratamiento del dolor postquirúrgico). Ejemplos de tales composiciones, así como cómo se formulan, también se describen en la sección previa y a continuación. El anticuerpo anti-NGF y el opiáceo pueden estar presentes en una sola composición o pueden estar presentes como composiciones separadas. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF y el analgésico opiáceo están presentes en la misma composición. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF y el analgésico opiáceo están presentes en composiciones separadas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición sinérgica de un anticuerpo anti-NGF y un analgésico opiáceo.

En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-NGF para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico, en el que dicho uso comprende la administración simultánea y/o secuencial de un analgésico opiáceo. En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un analgésico opiáceo para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico, en el que dicho uso comprende la administración simultánea y/o secuencial de un anticuerpo anti-NGF. En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-NGF y un analgésico opiáceo para su uso separado, simultáneo y/o secuencial para el tratamiento del dolor postquirúrgico. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es el anticuerpo E3 como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, el analgésico opiáceo es morfina. Se entiende que las composiciones pueden comprender más de un antagonista del NGF. Por ejemplo, una composición puede comprender más de un miembro de una clase de antagonistas del NGF (por ejemplo, una mezcla de anticuerpos anti-NGF que reconocen diferentes

epítomos del NGF), así como miembros de clases diferentes de antagonistas del NGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF y un compuesto inhibitorio del NGF). Otras composiciones ejemplares comprenden más de un anticuerpo anti-NGF que reconoce el mismo epítopo(s), especies diferentes de anticuerpos anti-NGF que se unen a epítomos diferentes del NGF, o compuestos inhibitorios del NGF diferentes. En otros aspectos, la composición comprende uno o más antagonistas del NGF seleccionados del grupo constituido por un antagonista (por ejemplo, un anticuerpo) que se une (interacciona físicamente con) el NGF, un antagonista que se une a un receptor NGF (tal como el receptor TrkA o el receptor p75), y/o un antagonista que reduce (impide y/o bloquea) la señalización del receptor NGF aguas abajo.

La composición usada en la presente invención adicionalmente puede comprender vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams y Wilkins, Ed. K. E. Hoover), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones usadas, y pueden comprender tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido sórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 10 restos aproximadamente); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales 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 que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Los excipientes farmacéuticamente aceptables se describen en profundidad en el presente documento.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden contener compuestos adicionales conocidos por ser útiles para el tratamiento del dolor. El antagonista del NGF y el analgésico opiáceo, y sus composiciones también se pueden usar en combinación con otros agentes que sirven para mejorar y/o complementar la eficacia de los agentes.

Kits

La invención también proporciona kits para su uso en los presentes usos médicos. La invención proporciona un kit para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico que comprende un antagonista del NGF, en el que el antagonista del NGF se administra de manera simultánea, independiente o secuencial con un analgésico opiáceo para el tratamiento eficaz del dolor postquirúrgico; en el que el antagonista del NGF es un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión del NGF con su receptor trkA y p75 *in vivo*. Los kits para su uso en la invención incluyen uno o más recipientes que comprenden un anticuerpo anti-NGF, tal como el anticuerpo E3 humanizado descrito en el presente documento, y/o un analgésico opiáceo, y en algunas realizaciones, además comprenden instrucciones para su uso de acuerdo con cualquiera de los usos médicos para el dolor postquirúrgico descritos en el presente documento. En otras realizaciones, el kit comprende un anticuerpo anti-NGF que comprende una o más CDR del anticuerpo E3 (tal como una, dos, tres, cuatro, cinco, o, en algunas realizaciones, las seis CDR de E3). El kit además puede comprender la descripción de la selección de un individuo adecuado para el tratamiento basándose en la identificación de si ese individuo tiene dolor postquirúrgico o si el individuo presenta riesgo de dolor postquirúrgico. En otras realizaciones adicionales, el kit comprende un anticuerpo humanizado, (tal como el anticuerpo E3 descrito en el presente documento). En otras realizaciones más, las instrucciones comprenden la descripción de la administración de un anticuerpo anti-NGF en combinación con un analgésico opiáceo para tratar, prevenir y/o mejorar el dolor postquirúrgico.

En algunas realizaciones, el kit comprende un anticuerpo anti-NGF, un analgésico opiáceo, e instrucciones para la administración del anticuerpo anti-NGF y el analgésico opiáceo de manera simultánea, independiente o secuencial, para el tratamiento eficaz del dolor postquirúrgico.

En algunas realizaciones, el kit comprende un anticuerpo anti-NGF. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-NGF es un anticuerpo que comprende la región variable de la cadena pesada mostrada en la Tabla 1 y la región variable de la cadena ligera mostrada en la Tabla 2. En otras realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-NGF es un anticuerpo E3 como se describe en el presente documento.

El anticuerpo anti-NGF y el analgésico opiáceo se pueden presentar en recipientes separados o en un único recipiente. Se entiende que el kit puede comprender una composición distinta o dos o más composiciones en las que una composición comprende un anticuerpo anti-NGF y otra composición comprende un analgésico opiáceo.

Los kits para su uso en la presente invención, están en envases adecuados. Los envases adecuados incluyen, pero no están limitados a, viales, frascos, jarras, envases flexibles (por ejemplo, bolsas Mylar o de plástico selladas), y similares. Los kits opcionalmente pueden proporcionar componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa.

Las instrucciones que se refieren al uso de un anticuerpo anti-NGF generalmente incluyen información sobre la posología, calendario de dosificación, y vía de administración para el tratamiento previsto. Los recipientes pueden ser

de dosis unitaria, paquetes en bruto (por ejemplo, paquetes multidosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención normalmente son instrucciones escritas en una etiqueta o introducidas en el paquete (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables instrucciones legibles por máquinas (por ejemplo, instrucciones contenidas en un disco de almacenamiento óptico o magnético).

- 5 La etiqueta o el prospecto indica que la composición se usa para tratar, mejorar y/o prevenir el dolor postquirúrgico. Las instrucciones se pueden proporcionar para llevar a la práctica cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Los kits para su uso en la presente invención, están en envases adecuados. Los envases adecuados incluyen, pero no están limitados a, viales, frascos, jarras, envases flexibles (por ejemplo, bolsas Mylar o de plástico selladas), y similares. También se contemplan envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un 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 con disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con la aguja de una inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa con disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con la aguja de una inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo anti-NGF. El recipiente puede comprender además un segundo agente farmacéuticamente activo.

Los kits opcionalmente pueden proporcionar componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o una hoja insertada en el paquete o asociada al recipiente.

Administración de un antagonista del NGF y un analgésico opiáceo, y valoración del tratamiento

El anticuerpo anti-NGF y el analgésico opiáceo se pueden administrar a un individuo a través de cualquier vía adecuada. Por ejemplo, se pueden administrar juntos o individualmente por vía oral, intravenosa, sublingual, subcutánea, intraarterial, intramuscular, rectal, intraespinal, intratorácica, intraperitoneal, intraventricular, sublingual, transdérmica o por inhalación. Se pueden administrar por vía oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, chicles, caramelos, supositorios o similares preparados mediante procedimientos reconocidos en la técnica. Será evidente para una persona experta en la técnica que los ejemplos descritos en el presente documento no se pretende que sean limitantes sino ilustrativos de las técnicas disponibles.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el anticuerpo anti-NGF se administra a un individuo de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración por vía intravenosa, por ejemplo, en forma de bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, a través de la vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, por inhalación o por vía tópica. Los nebulizadores disponibles comercialmente para formulaciones líquidas, que incluyen nebulizadores a propulsión y nebulizadores ultrasónicos son útiles para la administración. Las formulaciones líquidas se pueden nebulizar directamente y el polvo liofilizado se puede nebulizar después de su reconstitución. Alternativamente, el antagonista del NGF se puede convertir en aerosol usando una formulación fluorocarbonada y un inhalador de dosis medida, o se puede inhalar en forma de polvo liofilizado y molido.

También son útiles para la administración las técnicas de administración local dirigida o específica de sitio. Ejemplos de técnicas de administración local dirigidas o específicas de sitio incluyen diversas fuentes de depósitos implantables del antagonista del NGF y/o el analgésico opiáceo, o catéteres de administración local, tales como catéteres para infusión, un catéter de aspiración, o un catéter de aguja, injerto sintéticos, espiras, derivaciones y endoprótesis adventicias u otros dispositivos implantables, vehículos específicos de sitio, inyección directa, uso de una técnica o dispositivo de analgesia controlada en el paciente (PCA), y/o aplicación directa. Véase, por ejemplo, la Publicación PCT N° WO 00/53211 y la patente de EE.UU. N° 5.981.568.

Para la administración se pueden usar diversas formulaciones de antagonistas del NGF tales como un anticuerpo anti-NGF. En algunas realizaciones, el antagonista del NGF se puede administrar puro. En algunas realizaciones, el antagonista del NGF comprende un anticuerpo anti-NGF, y puede estar en diversas formulaciones, incluyendo formulaciones que comprenden un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica, y son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, pero no están limitados a, agentes solubilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales de osmolaridad variable, agentes de encapsulación, tampones, y potenciadores de penetración cutánea. Los excipientes, así como las formulaciones para la administración parenteral y no parenteral de fármacos, se exponen en Remington, y col., The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

En algunas realizaciones, el antagonista del NGF se formula para su administración mediante inyección (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscularmente, etc.). Por consiguiente, estos agentes se pueden combinar con vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y similares. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, el tiempo y la repetición, dependerá del

individuo particular y del historial clínico del individuo. El régimen de dosificación (incluyendo el antagonista(s) del NGF usado) puede variar a lo largo del tiempo.

5 Un anticuerpo anti-NGF se puede administrar usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo mediante inyección (por ejemplo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intramuscularmente, etc.). Un anticuerpo anti-NGF también se puede administrar por inhalación, como se describe en el presente documento. En general, para la administración de anticuerpos anti-NGF, una dosificación candidata inicial puede ser de 2 mg/kg aproximadamente. En algunas realizaciones, una dosificación diaria típica puede abarcar entre cualquiera de 3 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3 mg/kg a 30 mg/kg a 100 mg/kg aproximadamente o superior, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas a lo largo de varios días o más tiempo, dependiendo de la dolencia, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas o hasta que se consigan niveles terapéuticos suficientes para reducir el dolor. Un régimen de dosificación ejemplar comprende la administración de una dosis inicial de 2 mg/kg aproximadamente, seguido del mantenimiento de la dosis durante una semana a 1 mg/kg de anticuerpo anti-NGF aproximadamente, o seguido del mantenimiento de la dosis a 1 mg/kg durante otra semana. No obstante, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de caída farmacocinética que el facultativo desee conseguir. Por ejemplo, está contemplada una dosificación de una-cuatro veces por semana. Otros regímenes de dosificación incluyen un régimen de hasta 1 vez al día, de 1 a 4 veces por semana, o menos frecuentemente. En algunas realizaciones, los compuestos se administran aproximadamente una vez por semana, aproximadamente de 1 a 4 veces al mes. En el presente documento se describe la dosificación de anticuerpos anti-NGF. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

20 En algunas realizaciones, cuando no es un anticuerpo, un antagonista del NGF según la divulgación se puede administrar (en algunas realizaciones) a una tasa de 0,1 a 300 mg/kg de peso corporal del paciente dividido de una a tres dosis, como se describe en el presente documento. En algunos pacientes adultos de peso normal, se pueden administrar en dosificaciones que abarcan entre 0,3 y 5,00 mg/kg aproximadamente. El régimen de dosificación particular, es decir, la dosis, el tiempo y la repetición, dependerá del individuo particular y del historial clínico del individuo, así como las propiedades de los agentes individuales (tales como la semi-vida del agente, y otras consideraciones bien conocidas en la técnica).

30 Los analgésicos opiáceos se pueden administrar a un nivel de dosificación hasta los niveles de dosificación convencionales para esos analgésicos. En alguna realización, el analgésico opiáceo se administra a un nivel reducido. Los niveles de dosificación adecuados dependerán del efecto analgésico del analgésico opiáceo elegido, pero normalmente los niveles adecuados serán de 0,001 a 25 mg/kg al día aproximadamente, de 0,005 a 10 mg/kg al día aproximadamente, o de 0,05 a 1 mg/kg al día aproximadamente, o inferior. El compuesto se puede administrar a un régimen de hasta 6 veces al día (o superior), 1 a 4 veces al día, o se puede administrar menos a menudo. En algunas realizaciones, el analgésico opiáceo se administra continuamente, o muy frecuentemente (como con, por ejemplo, PCA).

35 Cuando se administran en combinación, ya sea como composición única o como composiciones separadas, el antagonista del factor de crecimiento nervioso y el analgésico opiáceo se presentan en una relación que es consistente con la manifestación del efecto deseado. En algunas realizaciones, la relación ponderal del antagonista del factor de crecimiento nervioso al analgésico opiáceo será de 1 a 1 aproximadamente. En algunas realizaciones, esta relación puede estar entre 0,001 aproximadamente a 1 aproximadamente y 1000 aproximadamente a 1 aproximadamente, o entre 0,01 aproximadamente a 1 aproximadamente y 100 aproximadamente a 1 aproximadamente. Están contempladas otras relaciones.

45 Se apreciará que la cantidad de un antagonista del factor de crecimiento nervioso y el analgésico opiáceo necesario para su uso en el tratamiento o prevención del dolor variará no solo con los compuestos y composiciones particulares seleccionados, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la dolencia a tratar, y la edad y condición del paciente, la evolución o la fase del tratamiento, y en último término estará a discreción del facultativo que atiende. Por ejemplo, la dosificación apropiada de un antagonista del NGF (tal como un anticuerpo anti-NGF) dependerá del antagonista(s) del NGF (o sus composiciones) empleado, el tipo y gravedad de dolor a tratar, si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al agente, y la discreción del facultativo que atiende. Normalmente el facultativo administrará un antagonista del NGF, tal como un anticuerpo anti-NGF, hasta que se alcance una dosificación que consiga el resultado deseado.

55 Las consideraciones empíricas, tales como la semi-vida, generalmente contribuirán a la determinación de la dosificación. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos que son compatibles con el sistema inmunitario humano, tales como anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanos, para prolongar la semi-vida del anticuerpo y evitar que el anticuerpo sea atacado por el sistema inmunitario del hospedador. La frecuencia de la administración se puede determinar y ajustarse durante el transcurso de la terapia, en general se basa, pero no necesariamente, en el tratamiento y/o supresión y/o mejora y/o retraso del dolor. Alternativamente, pueden ser apropiadas formulaciones de liberación continua sostenida de un antagonista del NGF y/o un analgésico opiáceo. En la técnica se conocen diversas formulaciones y dispositivos para conseguir una liberación sostenida.

60 En una realización, las dosificaciones para un antagonista del NGF se pueden determinar empíricamente en individuos que hayan recibido una o más administraciones de un antagonista del NGF para tratar el dolor. Los individuos reciben

dosificaciones crecientes de un antagonista del NGF, es decir, un anticuerpo anti-NGF, en combinación con un analgésico opiáceo. Para valorar la eficacia del tratamiento, se puede seguir un indicador del dolor.

La administración de un antagonista del NGF y el analgésico opiáceo de acuerdo con el procedimiento de la presente invención puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, de la condición fisiológica del receptor, si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico, y otros factores conocidos por facultativos expertos. La administración de un antagonista del NGF puede ser esencialmente continua durante un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser en una serie de dosis espaciadas, por ejemplo, ya sea antes; durante; o después del desarrollo del dolor; antes y después; durante y después; antes y durante; o antes, durante, o después del desarrollo del dolor. Por ejemplo, la administración puede ser antes, durante y/o después de que se produzca una herida, incisión, traumatismo, cirugía, y cualquier otro acontecimiento que probablemente dé lugar a dolor.

En algunas realizaciones, puede estar presente más de un antagonista del NGF, tal como un anticuerpo. Los antagonistas pueden ser iguales o diferentes entre sí. Pueden estar presentes al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más antagonistas del NGF diferentes. Generalmente, esos antagonistas del NGF tienen actividades complementarias que no interfieren adversamente entre sí. Los antagonistas del NGF también se puede usar en combinación con otros agentes que sirven para mejorar y/o complementar la eficacia del agentes.

En algunas realizaciones, puede haber más de un analgésico opiáceo. Los analgésicos opiáceos pueden ser iguales o diferentes entre sí. Puede haber al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más analgésicos opiáceos diferentes. Generalmente, esos analgésicos opiáceos tienen actividades complementarias que no interfieren adversamente entre sí. También pueden usarse uno o más analgésicos opiáceos en combinación con otros agentes que sirven para mejorar y/o complementar la eficacia de uno o más agentes.

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

Los liposomas que contienen el antagonista del NGF (tal como un anticuerpo) se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, como se describe en Epstein, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); y las patentes de EE.UU. Nº 4.485.045 y 4.544.545. Liposomas con tiempos de circulación mejorados se describen en la patente de EE.UU. Nº 5.013.556. Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poro definidos para dar liposomas con el diámetro deseado.

Los principios activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanoparticuladas y nanocápsulas) y en macroemulsiones. Esas técnicas se describen en Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(vinilalcohol), poliláctidos (patente de EE.UU. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de 7-etilo, etilenoacetato de vinilo 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), acetato isobutirato de sacarosa, y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se puede conseguir fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Por ejemplo, generalmente se ponen composiciones del anticuerpo anti-NGF terapéutico en un recipiente con un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una

bolsa con disolución intravenosa o un vial con un tapón perforable con la aguja de una inyección hipodérmica.

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

5 Para la preparación de composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico, por ejemplo, principios de formación de comprimidos convencionales tales como fécula de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato de dicalcio o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto para su uso en la presente invención, o una de sus sales no tóxicas farmacéuticamente aceptables. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se quiere decir que el principio activo se dispersa homogéneamente por toda la composición de manera que la composición se puede subdividir fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta composición de preformulación sólida a continuación se subdivide en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen de 0,01 mg aproximadamente a 0,1 mg aproximadamente a 500 mg aproximadamente del principio activo de la presente invención. Los comprimidos o píldoras de la nueva composición se pueden recubrir o se pueden componer de otra forma para proporcionar una forma de dosificación que produzca la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o la píldora puede comprender un componente de dosificación interno y de dosificación externo, este último que está en forma de envuelta sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Se pueden usar una variedad de materiales para esas capas o cubiertas entéricas, tales materiales que incluyen una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

25 Las formas líquidas en las que las composiciones para su uso según la presente invención se pueden incorporar para la administración por vía oral o mediante inyección, incluyen disoluciones acuosas, jarabes convenientemente aromatizados, suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares. Los agentes dispersantes o suspensores adecuados para suspensiones acuosas incluyen gomas naturales y sintéticas tales como tragacanto, goma arábiga, alginato, dextrano, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, polivinilpirrolidona o gelatina. Los principios activos también se pueden incorporar en productos de liberación controlada muy viscosos tales como acetato isobutirato de sacarosa u otros. Estas formulaciones se pueden usar para dosificación oral, o para inyección. La inyección puede dar como resultado un depósito local del fármaco que se libera localmente durante el transcurso de 1 día a tres meses.

35 Las composiciones para la administración mediante inyección incluyen aquellas que comprenden un antagonista del NGF y un analgésico opiáceo, como principios activos, en asociación con un agente de superficie activa (o agente humectante o tensioactivo) o en forma de emulsión (como una emulsión de agua en aceite o de aceite en agua).

40 Los agentes de superficie activa adecuados incluyen, en particular, agentes no iónicos, tal como polioxietilensorbitanes (por ejemplo, Tween™ 20, 40, 60, 80 u 85) y otros sorbitanes (por ejemplo, Span™ 20, 40, 60, 80 u 85). Las composiciones con un agente de superficie activa comprenderán de manera conveniente entre el 0,05 y el 5% del agente de superficie activa, o entre el 0,1 y el 2,5%. Se apreciará que, si fuera necesario, se pueden añadir otros principios, por ejemplo, manitol u otros vehículos farmacéuticamente aceptables.

45 Las emulsiones adecuadas se pueden preparar usando emulsiones grasas disponibles comercialmente, tales como Intralipid™, Liposyn™, Infontrol™, Lipofondin™ y Lipiphysan™. El principio activo se puede disolver en una composición en emulsión premezclada o alternativamente se puede disolver en un aceite (por ejemplo, aceite de soja, aceite de alazor, 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, fosfolípidos de soja o lecitina de soja) y agua. Se apreciará que se pueden añadir otros principios, por ejemplo, glicerol o glucosa, para ajustar la tonicidad de la emulsión. Las emulsiones adecuadas normalmente contendrán hasta el 20% de aceite, por ejemplo, entre el 5 y el 20%. La emulsión grasa puede comprender gotículas de grasa de entre 0,1 y 1,0 µm, particularmente entre 0,1 y 0,5 µm, y tener un pH en el intervalo de 5,5 a 8,0.

En algunas realizaciones, las composiciones en emulsión son aquellas preparadas mezclando un antagonista del factor de crecimiento nervioso con Intralipid™ o sus componentes (aceite de soja, fosfolípidos de huevo, glicerol y agua).

55 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes orgánicos o acuosos farmacéuticamente aceptables, o sus mezclas, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como los expuestos anteriormente. Las composiciones se administran mediante la vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferentemente estériles se pueden nebulizar mediante el uso de gases. Las disoluciones nebulizadas se pueden inhalar directamente del dispositivo de nebulización o el

dispositivo de nebulización se puede acoplar a una máscara facial, una cabina o una máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones en disolución, suspensión, o en polvo se pueden administrar (incluyendo oral o nasalmente) desde dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada.

La eficacia del tratamiento se puede valorar mediante procedimientos muy conocidos en la técnica.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Tratamiento con anticuerpo monoclonal anti-NGF en combinación con un analgésico opiáceo para tratar el dolor postquirúrgico

- 10 Se utilizó un modelo de dolor que mimetizaba el dolor postquirúrgico para valorar la eficacia de un anticuerpo anti-NGF en combinación con un analgésico opiáceo, la morfina. En cada experimento se utilizaron 16 animales (n = 8 por grupo).

15 Animales. Para cada experimento, se estabularon 16 ratas macho Sprague-Dawley adultas con un peso de 200-220 g (Harlan; Indianápolis, IN) en condiciones de luz normal durante al menos una semana antes de utilizarlas, con comida y agua a voluntad. Después de un periodo de 2 horas de aclimatación en las cámaras de prueba el día previo a la cirugía, las ratas se dividieron en dos grupos: uno que recibe anticuerpo 15 horas antes de cirugía, y el otro que recibe el vehículo (5% de dextrosa/0,45% de USP salino) a ese tiempo. Se administró anticuerpo anti-NGF antagonista Mab 911 (véase, Hongo, y col., Hybridoma 19: 215-227 (2000)) a concentraciones que abarcan entre 0,3 y 20 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.). Se administró sulfato de morfina a diversas concentraciones que abarcan entre 0,1, 0,3, 1 y 3 mg/kg subcutáneamente (s.c.) 24 horas después de cirugía a todos los animales. A ningún animal se le administró más de dos dosis diferentes de morfina, las dosis tenían una separación de al menos 2 horas, y la dosis más alta siempre se administró en segundo lugar. Por ejemplo, en un experimento típico, a la mitad de los animales se les administró una dosis de anticuerpo anti-NGF 15 horas antes de cirugía, por vía intraperitoneal (i.p.), los animales se sometieron a cirugía en una pata y se dejaron recuperar. 22 horas después de la cirugía, las ratas se sometieron a pruebas para su dolor en reposo "basal" y dos horas más tarde se les administró una dosis más baja de morfina (normalmente 0,3 mg/kg). 30 minutos después de la dosis de morfina, se determinó el dolor en reposo como anteriormente, y dos horas después de la dosis inicial de morfina se administró la dosis más alta (normalmente 1,0 mg/kg). Después de 30 minutos más, se determinó de nuevo el dolor en reposo como anteriormente.

25 La cirugía se basó en el procedimiento descrito por Brennan, y col., Pain 64: 493-501 (1996). Se anestesió a los animales con el 2% de isoflurano y mezcla de aire que se mantuvo durante la cirugía a través de un cono nasal. La superficie plantar de la pata derecha se preparó con una gasa de povidona yodada, y se realizó una incisión longitudinal central de 1 cm a través de la piel y la fascia, comenzando a 0,5 cm del borde del talón y que se extiende hacia los dedos. Se realizaron mediciones con una regla con el pie sujeto en posición flexionada. Los músculos plantares se levantaron usando un fórceps curvado y se realizó una incisión longitudinal. Se hizo una incisión a lo largo de la profundidad completa del músculo, entre el origen y la inserción. El sangrado se controló a lo largo de toda la cirugía mediante presión aplicada con una gasa. La herida se cerró con dos suturas no absorbibles (monofilamento negro de *ethilon* 5-0). Estas suturas se anudaron 5-6 veces, con el primer nudo atado flojo. La zona de la herida se lavó con una disolución de bacitracina. Se dejó recuperarse a los animales y descansar en jaulas limpias durante al menos dos horas antes de comenzar las pruebas de comportamiento.

30 Evaluación del dolor en reposo. Se usó una puntuación del dolor acumulativo para valorar el dolor relacionado con la carga de peso. Los animales se pusieron en una red de plástico (rejilla: 8 mm²) en jaulas de plástico limpias que se elevaron sobre una plataforma (h: 18") que permiten la inspección de la parte inferior de las patas. Después de un periodo de aclimatación de 20 minutos, se valoró la carga de peso en una escala de 0 a 2. Se dio una puntuación de 0 si la pata se blanquea o se presiona contra la red, que indica una carga de peso completa. Se dio una puntuación de 1 si la pata se coloca con la piel justo tocando la red, sin blanqueo o indentación de la piel. Se dio una puntuación de 2 si la pata se mantiene completamente fuera de la red. La retirada de la pata se considera un 2 si la rata aún está en reposo. Cada animal se observó durante 1 minuto cada 5 minutos durante 30 minutos. La suma de las 6 puntuaciones (0-12) durante un periodo de media hora se usó para valorar el dolor en la pata con incisión. También se calculó la frecuencia de las puntuaciones de 2 y se usó para valorar la incidencia de dolor grave o defensa total de la pata por el animal. Cada animal se sometió a pruebas 24 horas antes de cirugía (línea basal), y 2 h, y 24 h después de cirugía. El carga de peso era una buena correlación de cuán dispuestos estaban los animales a usar el miembro, y por tanto era una medida eficaz del alivio del dolor.

35 El siguiente protocolo se usó para los experimentos representados en las figuras 1, 2, y 3. Los animales se dividieron en dos grupos (control y tratados con anticuerpo). Se administró anticuerpo anti-NGF de ratón Mab 911 (Hongo y col., supra) por vía intraperitoneal 15 horas antes de cirugía (a 0,3 mg/kg de peso corporal y/o 1 mg/kg de peso corporal, dependiendo del experimento). Los animales control no recibieron anticuerpo pero recibieron nada, 0,3 mg/kg, o 1 mg/kg de morfina como se describe en el presente documento. La cirugía se realizó como se ha descrito anteriormente, y el dolor en reposo se valoró 22 horas después de la cirugía en ambos grupos ("basal"). A las 24 horas de la cirugía,

5 todos los animales se trataron con morfina a 0,3 mg/kg y se valoró el dolor en reposo empezando 30 minutos después del tratamiento con morfina. Se administró una dosis de 1,0 mg/kg de morfina adicional 26 horas después de la cirugía y se volvió a valorar el dolor en reposo comenzando 30 minutos después de esta última dosis de morfina. Todos los tratamientos con morfina se administraron subcutáneamente, bajo la nuca del animal. Los resultados de estos experimentos se representan en las figuras 1, 2, y 3.

10 La Figura 1 representa la puntuación del dolor en reposo medido en animales que recibieron 0,3 mg/kg de anticuerpo anti-NGF 911 y 0, 0,3 mg/kg de peso corporal o 1,0 mg/kg de peso corporal de morfina. Este experimento demuestra que la puntuación del dolor acumulativo se redujo en animales tratados con morfina en combinación con un antagonista del NGF, el anticuerpo anti-NGF 911, comparado con el tratamiento con morfina sola o anticuerpo anti-NGF solo. Estos resultados también demuestran que el tratamiento con antagonista del NGF solo antes de cirugía a 0,3 mg/kg fue más eficaz en la reducción del dolor en reposo que el tratamiento con 0,3 mg/kg de morfina sola.

15 La Figura 2 representa la puntuación del dolor en reposo medido en animales que recibieron 1,0 mg/kg de anticuerpo anti-NGF 911, y 0, 0,3 mg/kg de peso corporal o 1,0 mg/kg de peso corporal de morfina. Estos resultados demuestran que la puntuación del dolor acumulativo se redujo en animales tratados con morfina en combinación con un anticuerpo anti-NGF, comparado con el tratamiento con anticuerpo anti-NGF solo o morfina sola. Así, el anticuerpo anti-NGF más morfina fue más eficaz en la reducción del dolor en reposo que la morfina sola o el anticuerpo anti-NGF solo. Estos resultados también demuestran que el tratamiento con anticuerpo anti-NGF solo antes de cirugía a 1 mg/kg fue más eficaz en la reducción del dolor en reposo que el tratamiento con 0,3 mg/kg de morfina sola.

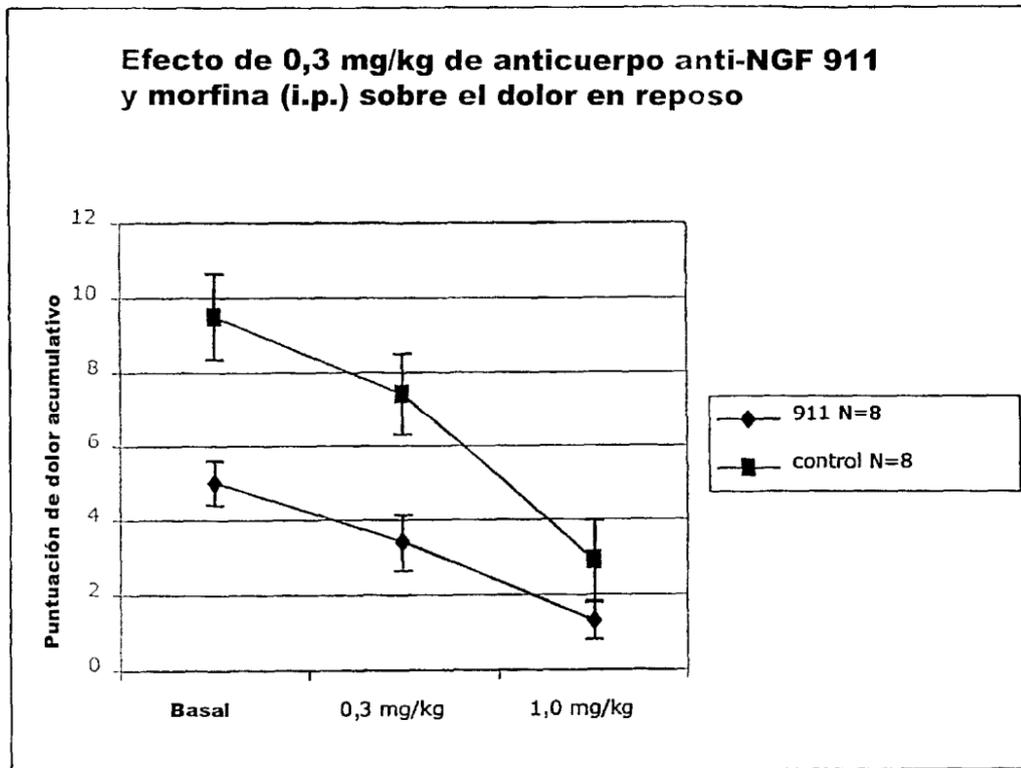
20 La Figura 3 representa las puntuaciones del dolor en reposo después del tratamiento con 0,3 mg/kg o 1 mg/kg de anticuerpo anti-NGF y con 0, 0,3 mg/kg o 1,0 mg/kg de peso corporal de morfina según el procedimiento descrito anteriormente. El tratamiento con 0,3 mg/kg de morfina en combinación con 0,3 mg/kg de anticuerpo anti-NGF o 1 mg/kg de anticuerpo anti-NGF mejoró significativamente el alivio del dolor comparado con el tratamiento con 0,3 mg/kg de morfina sola. Los resultados mostrados en la Figura 3 también demuestran que el tratamiento con 0,3 mg/kg o 1 mg/kg de anticuerpo anti-NGF solo (es decir, en ausencia de tratamiento con morfina) proporcionó un alivio del dolor equivalente al alivio del dolor siguiendo el tratamiento con una dosis de 0,3 mg/kg de morfina. Además, el tratamiento con un anticuerpo anti-NGF a 1,0 mg/kg en combinación con el tratamiento con morfina a 0,3 mg/kg dio un alivio del dolor al menos igual al obtenido con 1 mg/kg de morfina sola. Estos resultados demuestran que el tratamiento con un anticuerpo anti-NGF reduce la cantidad de morfina necesaria para un alivio eficaz del dolor.

30 Estos experimentos demuestran que el tratamiento con anticuerpo anti-NGF más morfina es más eficaz en la reducción del dolor en reposo que la morfina sola o que el tratamiento con anticuerpo solo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un antagonista del factor de crecimiento nervioso (NGF) y un analgésico opiáceo para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico, mediante el cual el antagonista del NGF y el analgésico opiáceo en combinación proporcionan un alivio del dolor eficaz, y en el que el antagonista del NGF es un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión del NGF con sus receptores trkA y p75 *in vivo*.
2. El antagonista del NGF y analgésico opiáceo para su uso según la reivindicación 1, en el que el analgésico opiáceo se selecciona del grupo que consiste en morfina, codeína, dihidrocodeína, diacetilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, levorfanol, oximorfona, alfentanilo, buprenorfina, butorfanol, fentanilo, sufentanilo, meperidina, metadona, nalbufina, propoxifeno y pentazocina.
- 10 3. El antagonista del NGF y analgésico opiáceo para su uso según la reivindicación 2, en el que el analgésico opiáceo es morfina.
4. El antagonista del NGF y analgésico opiáceo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo anti-NGF se une al NGF humano.
- 15 5. El antagonista del NGF y analgésico opiáceo para su uso según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-NGF se une al NGF humano con una afinidad de unión de 10 nM aproximadamente o inferior a 10 nM aproximadamente.
6. El antagonista del NGF y analgésico opiáceo para su uso según las reivindicaciones 4 o 5, en el que el anticuerpo anti-NGF es un anticuerpo humano.
- 20 7. El antagonista del NGF y analgésico opiáceo para su uso según las reivindicaciones 4 o 5, en el que el anticuerpo anti-NGF es un anticuerpo humanizado.
8. El antagonista del NGF y analgésico opiáceo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo anti-NGF se une al mismo epítipo del NGF humano que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- 25 9. El antagonista del NGF y analgésico opioide para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo anti-NGF comprende tres CDR de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1; y tres CDR de una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2.
10. El antagonista del NGF y analgésico opioide para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2.
- 30 11. El uso de un antagonista del NGF y un analgésico opiáceo en la fabricación de medicamentos para su uso en combinación en un procedimiento para el tratamiento del dolor postquirúrgico, mediante el cual el antagonista del NGF y el analgésico opiáceo en combinación proporcionan un alivio eficaz del dolor; y en el que el antagonista del NGF es un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión del NGF con sus receptores trkA y p75 *in vivo*.
- 35 12. Un producto que comprende un antagonista del NGF y un analgésico opiáceo como una preparación combinada para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico, en el que el antagonista del NGF es un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión del NGF con sus receptores trkA y p75 *in vivo*.
13. Una composición farmacéutica que comprende un antagonista del NGF y un analgésico opiáceo, en el que el antagonista del NGF es un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión del NGF con sus receptores trkA y p75 *in vivo*.
- 40 14. Un kit para su uso en el tratamiento del dolor postquirúrgico que comprende un antagonista del NGF, en el que el antagonista del NGF se administra de manera simultánea, independiente o secuencial con un analgésico opiáceo para el tratamiento eficaz del dolor posquirúrgico; en el que el antagonista del NGF es un anticuerpo anti-NGF que inhibe la unión del NGF con sus receptores trkA y p75 *in vivo*.

FIGURA 1



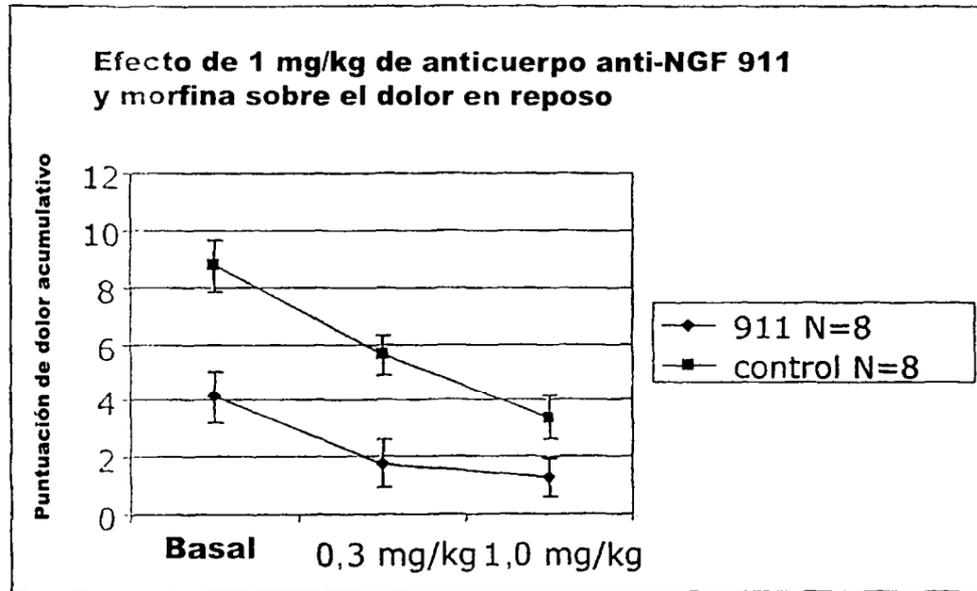


FIGURA 2

Efecto de anticuerpo anti-NGF y morfina sobre el dolor en reposo

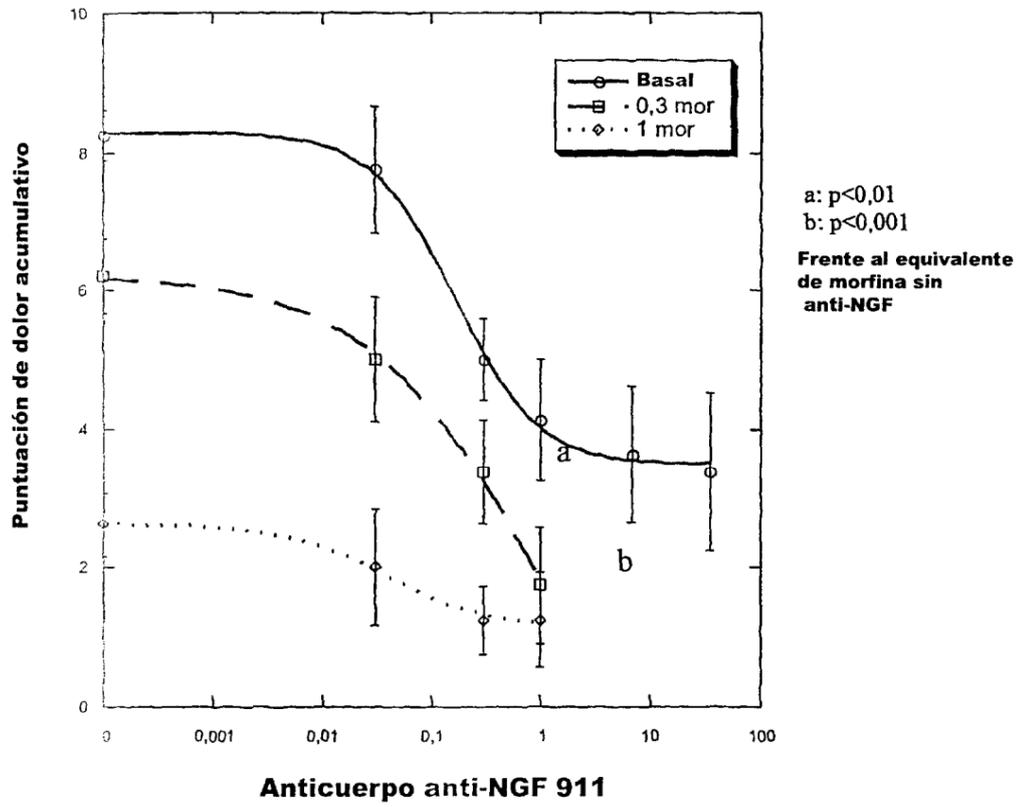


FIGURA 3