SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 11-161350- -00000-0000
Fecha: 2011-11-24 14:48:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: **ANTICUERPOS CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF) CON ESTABILIDAD IN VIVO MEJORADA**

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: **C07K 16/22, A61K 39/395, C12N 5/10, C12N 15/13, A61P 25/00**

71. SOLICITANTE: **ABBOTT RESEARCH B.V.**

DOMICILIO: **Meeuwenlaan 4, P.O.BOX 365, NL-8000 AJ Zwolle, HOLANDA**

74. APODERADO: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS A.**

22. BOGOTA, D.C., _____

000001

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-161350- -00000-0000 › de radicación

Fecha: 2011-11-24 14:48:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

(1)

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I [ ] Capítulo II

(2) SOLICITANTE (71)	Nombre: **ABBOTT RESEARCH B.V.** Dirección: **Meeuwenlaan 4** **P.O.BOX 365** **NL-8000 AJ Zwolle** **HOLANDA** Nacionalidad o Domicilio: **AJ Zwolle - HOLANDA** Lugar de Constitución: **HOLANDA** Teléfono: Fax: E-mail:	**IDENTIFICACIÓN** C.C. [ ] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] Cual Número
(3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: **Dra. Margarita Castellanos A.** Dirección: **CALLE 94A No. 7A-09** Teléfono: **7560770** Fax: **7550158** E-mail: info@castellanosyco.com	**IDENTIFICACIÓN** C.C. [X] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] Cual Número **2.930.616** TPA **2.698**
(4) INVENTOR (ES) (72)	**VER ANEXO # 1**	

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. **PCT/IB2010/001210** Fecha **04/05/2010**

Publicación Internacional No. **WO 2010/128398 A1** Fecha **11/11/2010**

(6) **Título (54)** **ANTICUERPOS CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF) CON ESTABILIDAD IN VIVO MEJORADA**

(7) **Clasificación Internacional (51)** **C07K 16/22, A61K 39/395, C12N 5/10, C12N 15/13, A61P 25/00**

(8) **Prioridad** SI [X] NO [ ]

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	04/05/2009	61/175,228
US	21/07/2009	61/227,251
US	01/09/2009	61/238,813
US	16/10/2009	61/252,314

(9) **Comprobantes de pago Nos.** **11-110186 y 11-110187** **Fecha** **Noviembre 10 de 2011**

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

(10) Anexos

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [X] Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indigenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros: **Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación, Formas PCT/IB306 (Notificación de Cambios)**

(11) FIGURA CARACTERISTICA:

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

FIRMA:

C.C. No. 39.779.654 Bogotá TPA 70.819 C.S.J.

24 NOV. 2011

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página. - MCA/gcb - P2342

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. – COLOMBIA

ANEXO # 1
INVENTORES

1. **JOHN POWELL**
   28 Short Road
   Stretham, Ely
   Cambridgeshire CB6 3LS
   GRAN BRETAÑA

2. **MARK MAGINN**
   53 High Street
   Wilburton
   Cambridgeshire CB6 3RA
   GRAN BRETAÑA

3. **DUNCAN CASSON**
   The Paddock, Pedlers Lane
   Therfield, Royston
   Hertfordshire SG8 9PX
   GRAN BRETAÑA

4. **ANDREA BEST**
   510 Buena Road
   Lake Forest, IL 60045
   ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

5. **WEI LIU**
   1287 Derby Lane
   Mundelein, IL 60060
   ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

6. **SANDEEP DUTTA**
   7303 Clem Drive
   Gurnee, IL 60031
   ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

7. **JERRY A. HALL**
   451 Cross Road
   Gurnee, IL 60031
   ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

000004

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 110186

Bogotá D.C., Noviembre 10 de 2011 - 14:41:19

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	383921145	10/11/2011	13.478.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	571.000.00	571.000.00
				$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-161350- -00000-0000

Fecha: 2011-11-24 14:48:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO 000005
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 110187

Bogotá D.C., Noviembre 10 de 2011 - 14:41:19

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	383921145	10/11/2011	13.478.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
73	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICICIALES	27.000.00	1.971.000.00
				$1.971.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N NOVECIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-161350- -00000-0000

Fecha: 2011-11-24 14:48:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

000006

PATENT COOPERATION TREATY PCT/IB2010/001210

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

WOODS, Geoffrey, Corlett
J.A. Kemp & Co.
14 South Square
Gray's Inn
London WC1R 5JJ
ROYAUME-UNI

Date of mailing *(day/month/year)*
13 October 2011 (13.10.2011)

Applicant's or agent's file reference
N.111160

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2010/001210

International filing date *(day/month/year)*
04 May 2010 (04.05.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
PANGENETICS 110 B.V.
Yalelaan 46
NL-3584 CM Utrecht
Netherlands

State of Nationality: NL
State of Residence: NL
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
ABBOTT RESEARCH B.V.
Meeuwenlaan 4
P.O.Box 365
NL-8000 AJ Zwolle
Netherlands

State of Nationality: NL
State of Residence: NL
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 910 06 10

Authorized officer
Diot Sylvie
e-mail ro.ib@wipo.int
Telephone No. +4122 338 9608

000007

PATENT COOPERATION TREATY PCT/IB2010/001210

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

WOODS, Geoffrey, Corlett
J.A. Kemp & Co.
14 South Square
Gray's Inn
London WC1R 5JJ
ROYAUME-UNI

Date of mailing *(day/month/year)*
15 February 2011 (15.02.2011)

Applicant's or agent's file reference
N.111160

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2010/001210

International filing date *(day/month/year)*
04 May 2010 (04.05.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality | State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
BEST, Andrea
510 Buena Road
Lake Forest, IL 60045
United States of America

State of Nationality: US | State of Residence: US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The person indicated in box 2 has been added to the record as inventor for all designated States and applicant for US only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 910 06 10

Authorized officer
GarciaM Sonnia
e-mail ro.ib@wipo.int
Telephone No. +4122 338 8012

Form PCT/IB/306 (January 2009) 1/ERKK9BUI0

000008

PATENT COOPERATION TREATY PCT/IB2010/001210

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

WOODS, Geoffrey, Corlett
J.A. Kemp & Co.
14 South Square
Gray's Inn
London WC1R 5JJ
ROYAUME-UNI

Date of mailing *(day/month/year)*
15 February 2011 (15.02.2011)

Applicant's or agent's file reference
N.111160

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2010/001210

International filing date *(day/month/year)*
04 May 2010 (04.05.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
LIU, Wei 1287 Derby Lane Mundelein, IL 60060 United States of America	CN	US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The person indicated in box 2 has been added to the record as inventor for all designated States and applicant for US only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 910 06 10	Authorized officer GarciaM Sonnia e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8012

Form PCT/IB/306 (January 2009) 1/ERKLECCB0

000009

PATENT COOPERATION TREATY PCT/IB2010/001210

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

WOODS, Geoffrey, Corlett
J.A. Kemp & Co.
14 South Square
Gray's Inn
London WC1R 5JJ
ROYAUME-UNI

Date of mailing *(day/month/year)*
15 February 2011 (15.02.2011)

Applicant's or agent's file reference
N.111160

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2010/001210

International filing date *(day/month/year)*
04 May 2010 (04.05.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
DUTTA, Sandeep 7303 Clem Drive Gurnee, IL 60031 United States of America	IN	US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The person indicated in box 2 has been added to the record as inventor for all designated States and applicant for US only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 910 06 10	Authorized officer GarciaM Sonnia e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8012

Form PCT/IB/306 (January 2009) 1/ERKLCR6M0

000010

PATENT COOPERATION TREATY PCT/IB2010/001210

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

WOODS, Geoffrey, Corlett
J.A. Kemp & Co.
14 South Square
Gray's Inn
London WC1R 5JJ
ROYAUME-UNI

Date of mailing *(day/month/year)*
15 February 2011 (15.02.2011)

Applicant's or agent's file reference
N.111160

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2010/001210

International filing date *(day/month/year)*
04 May 2010 (04.05.2010)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
HALL, Jerry, A. 451 Cross Road Gurnee, IL 60031 United States of America	US	US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The person indicated in box 2 has been added to the record as inventor for all designated States and applicant for US only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer GarciaM Sonnia
Facsimile No. +41 22 910 06 10	e-mail ro.ib@wipo.int Telephone No. +4122 338 8012

Form PCT/IB/306 (January 2009) 1/ERKLBYA30

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
11 November 2010 (11.11.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/128398 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/22 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IB2010/001210

(22) International Filing Date:
4 May 2010 (04.05.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

61/175,228	4 May 2009 (04.05.2009)	US
61/227,251	21 July 2009 (21.07.2009)	US
61/238,813	1 September 2009 (01.09.2009)	US
61/252,314	16 October 2009 (16.10.2009)	US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **PANGENETICS 110 B.V.** [NL/NL]; Yalelaan 46, NL-3584 CM Utrecht (NL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **POWELL, John** [GB/GB]; 28 Short Road, Stretham, Ely, Cambridgeshire CB6 3LS (GB). **MAGINN, Mark** [IE/GB]; 53 High Street, Wilburton, Cambridgeshire CB6 3RA (GB). **CASSON, Duncan** [GB/GB]; The Paddock, Pedlers Lane, Therfield, Royston, Hertfordshire SG8 9PX (GB).

(74) Agent: **WOODS, Geoffrey, Corlett**; J.A. Kemp & Co., 14 South Square, Gray's Inn, London WC1R 5JJ (GB).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: ANTIBODIES AGAINST NERVE GROWTH FACTOR (NGF) WITH ENHANCED IN VIVO STABILITY

(57) Abstract: The present invention provides anti-nerve growth factor (NGF) antibodies that contain an IgG4 constant region comprising a stabilizing hinge region mutation and wherein the antibodies exhibit an unexpectedly long serum half life in cynomolgus monkeys. Pharmaceutical compositions comprising the anti-NGF antibodies, nucleic acids encoding the NGF antibodies, host cells for expressing the NGF antibodies and methods of using the antibodies for treating NGF-related diseases or conditions are also provided.

WO 2010/128398 A1

ANTIBODIES AGAINST NERVE GROWTH FACTOR (NGF) WITH ENHANCED *IN VIVO* STABILITY

Background of the Invention

Nerve growth factor (NGF) is a secreted protein that was discovered over 50 years ago as a molecule that promotes the survival and differentiation of sensory and sympathetic neurons. The beta chain of NGF is solely responsible for the nerve growth stimulating activity of NGF. The beta chain homodimerizes and is incorporated into a larger protein complex. NGF is a member of a family of neurotrophic factors known as neurotrophins. NGF binds with high affinity to a tropomyosin receptor kinase known as TrkA. NGF is also capable of binding a receptor known as $p75^{NTR}$, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, which also interacts with other neurotrophins. The structure and function of NGF is reviewed in, for example, Sofroniew, M.V. *et al.* (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* 24:1217-1281; Weismann, C. and de Vos, A.M. (2001) *Cell. Mol. Life Sci.* 58:748-759; Fahnestock, M. (1991) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 165:1-26.

Although NGF was originally identified for its ability to promote the survival and differentiation of neurons, there is growing evidence that these developmental effects are only one aspect of the biology of NGF. In particular, NGF has been implicated in the transmission and maintenance of persistent or chronic pain. For example, both local and systemic administration of NGF have been shown to elicit hyperalgesia and allodynia (Lewin, G.R. *et al.* (1994) *Eur. J. Neurosci.* 6:1903-1912). Intravenous infusion of NGF in humans produces a whole body myalgia while local administration evokes injection site hyperalgesia and allodynia in addition to the systemic effects (Apfel, S.C. *et al.* (1998) *Neurology* 51:695-702). Furthermore, in certain forms of cancer, excess NGF facilitates the growth and infiltration of nerve fibers with induction of cancer pain (Zhu, Z. *et al.* (1999) *J. Clin. Oncol.* 17:241-228).

The involvement of NGF in chronic pain has led to considerable interest in therapeutic approaches based on inhibiting the effects of NGF (see *e.g.*, Saragovi, H.U. and Gehring, K. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.* 21:93-98). For example, a soluble form of the TrkA receptor was used to block the activity of NGF, which was shown to significantly reduce the formation of neuromas, responsible for neuropathic pain, without damaging the cell bodies of the lesioned neurons (Kryger, G.S. *et al.* (2001) *J. Hand Surg.* (Am.) 26:635-644).

Another approach to neutralizing NGF activity is the use of anti-NGF antibodies, examples of which antibodies have been described (see *e.g.*, PCT Publication Nos. WO 2001/78698, WO 2001/64247, WO 2002/096458, WO 2004/032870, WO 2005/061540, WO 2006/131951, WO 2006/110883, U.S. Patent No. 7,449,616; U.S. Publication Nos.

US 20050074821, US 20080033157, US 20080182978 and US 20090041717). In animal models of neuropathic pain (*e.g.*, nerve trunk or spinal nerve ligation) systemic injection of neutralizing antibodies to NGF prevents both allodynia and hyperalgesia (Ramer, M.S. and Bisby, M.A. (1999) *Eur. J. Neurosci.* 11:837-846; Ro, L.S. *et al.* (1999) *Pain* 79:265-274). Furthermore, treatment with a neutralizing anti-NGF antibody produces significant pain reduction in a murine cancer pain model (Sevcik, M.A. *et al.* (2005) *Pain* 115:128-141).

Thus, in view of the foregoing, additional NGF antagonists are desirable.

Summary of the Invention

This invention provides anti-NGF antibodies that exhibit enhanced *in vivo* stability. In particular, the invention provides an anti-NGF antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a mutation, preferably a hinge region mutation, and wherein the antibody exhibits an unexpectedly long terminal elimination half life, such as a terminal elimination half life in a cynomolgus monkey of at least 15 days and typically in the range of about 15 to about 22 days (or a range of 15 days to 22 days), or in a range of about 15 days to 28 days (or in a range of 15 days to 28 days), or in the range of about 21 days to about 28 days (or in range of 21 days to 28 days). This stabilized anti-NGF antibody (*e.g.*, hinge-stabilized antibody) also exhibits a terminal elimination half life in rats of at least 8 days, typically in the range of about 8 to about 9 days (or in range of 8 to 9 days). In yet other embodiments, the stabilized anti-NGF antibody (*e.g.*, hinge-stabilized antibody) may exhibit a mean terminal elimination half life in humans of at least 10-30 days, or at least 10 days, at least 15 days, at least 20 days, at least 25 days, at least 30 days or in a range of about 10 days to about 40 days or in a range of about 15 days to about 30 days (or in a range of 10 to 40 days or in a range of 15 to 30 days). In yet other embodiments, the stabilized anti-NGF antibody (*e.g.*, hinge-stabilized antibody) may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks).

Preferably, the mutation in the IgG4 constant region is a hinge region mutation. Even more preferably, the hinge region mutation in the IgG4 constant region comprises mutation of the serine at the amino acid position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 (which shows the wild type amino acid sequence of the human IgG4 constant region). Accordingly, the invention provides an anti-nerve growth factor (NGF) antibody having a human IgG4 constant region, said human IgG4 constant region containing a hinge region mutation comprising the mutation of serine at the amino acid

position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9. More preferably, the serine at the amino acid position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 is mutated to proline. In a preferred embodiment, the human IgG4 constant region of the anti-NGF antibody comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10. Alternatively, other possible IgG4-stabilizing mutations are described herein.

A preferred anti-NGF antibody of the invention is antibody PG110, the heavy chain amino acid sequence of which is shown in SEQ ID NO: 13 and the light chain amino acid sequence of which is shown in SEQ ID NO: 16. Accordingly, the invention provides an anti-NGF antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the antibody comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 and a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16. In another embodiment, the invention provides anti-NGF antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the antibody comprises a heavy chain encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11 and a light chain encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 14. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody comprising a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13, wherein the antibody has a terminal elimination half-life in a cynomolgus monkey of at least 15 days (and typically in the range of about 15 to about 22 days, or in a range of 15 to 22 days, or in a range of about 15 days to 28 days, or in a range of 15 to 28 days, or in the range of about 21 days to about 28 days or in range of 21 to 28 days), and/or has a terminal elimination half-life in a human of at least 10-30 days (or at least 10 days, or at least 15 days, or at least 20 days, or at least 25 days, or at least 30 days or in a range of about 10 days to about 40 days or in range of about 15 to about 30 days, or in a range of 10 to 40 days or in range of 15 to 30 days). Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks). Preferably, the heavy chain is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11. Preferably, the antibody comprises a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16. Preferably, the light chain is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 14.

In another embodiment, the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 (which shows the heavy chain variable region of PG110). In another embodiment, the anti-NGF antibody comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (which shows the light chain variable region of PG110). In yet another embodiment, the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising

the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. In still another embodiment, the anti-NGF antibody competes for binding to NGF with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

In another embodiment, the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively (wherein SEQ ID NOs: 3, 4 and 5 show the heavy chain variable region CDRs 1, 2 and 3, respectively, of PG110). In another embodiment, the anti-NGF antibody comprises a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively (wherein SEQ ID NOs: 6, 7 and 8 show the light chain variable region CDRs 1, 2 and 3, respectively, of PG110). In still another embodiment, the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, and comprises a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively.

Preferably, the anti-NGF antibody has one or more of the following functional properties:

a) binds to human NGF but does not bind to human brain-derived neurotrophic factor (BDNF), human neurotrophin 3 (NT-3) or human neurotrophin 4 (NT-4);

b) binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less;

c) inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$;

d) inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells;

e) inhibits NGF-dependent chick dorsal root ganglion survival;

f) inhibits NGF-dependent PC12 cell neurite outgrowth.

In another embodiment, the anti-NGF antibody of the invention does not exhibit a rebound effect when administered to a subject. For example, a dosage amount and dosing frequency of administration for the antibody can be selected such that the antibody does not exhibit a rebound effect when administered to a subject.

In another embodiment, an anti-NGF antibody of the invention is capable of alleviating pain in a subject for a long duration, for example for a duration of at least about one week, or at least about two weeks, or at least about four weeks, or at least about eight weeks, or at least about twelve weeks, or at least about one week to about twelve weeks, or at least about four weeks to about twelve weeks, or at least about eight weeks to about twelve weeks, or for a duration of at least one week, or at least two weeks, or at least four weeks, or at least eight weeks or at least twelve weeks or at least

one to twelve weeks, or at least four to twelve weeks, or at least eight to twelve weeks after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to the subject.

In a particularly preferred embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody that has the combined advantageous features of an extended terminal elimination half life and a prolonged duration of pain alleviation. Accordingly, the invention also provides an anti-NGF antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a mutation (preferably a hinge region mutation), wherein the antibody has a terminal elimination half-life in a human of at least 10-30 days, or at least 10 days, or at least 15 days, or at least 20 days, or at least 25 days, or at least 30 days or in a range of about 10 days to about 40 days or in a range of about 15 days to about 30 days (or in a range of 10-40 days or in a range of 15-30 days), and wherein the antibody alleviates pain for a duration of at least about one week to about twelve weeks, or at least one week to twelve weeks, or at least about four weeks to about twelve weeks, or at least four weeks to twelve weeks, after administration of a single dose the antibody to a human subject (or at least one week, or at least two weeks, or at least four weeks, or at least eight weeks, or at least twelve weeks, or one to twelve weeks, or four to twelve weeks, or eight to twelve weeks, after administration of a single dose of the antibody to a human subject). Preferably, the hinge region mutation comprises mutation of the serine at the amino acid position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9, preferably a serine to proline mutation at the amino acid position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9. More preferably, the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10. In various embodiments, the antibody may exhibit one or more of the functional properties described herein. In a preferred embodiment, the antibody competes for binding to NGF with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

In yet another embodiment, the invention provides an anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, and wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less. Preferably, the antibody has mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days, or at least 10 days, or at least 15 days, or at least 20 days, or at least 25 days, or at least 30 days or in a range of about 10 days to about 40 days or in a range of about 15 days to about 30 days (or in a range of 10-40 days or in a range of 15-30 days). Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days,

or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks). The antibody may further exhibit one or more additional functional properties, such as binding to human NGF but not binding to human brain-derived neurotrophic factor (BDNF), human neurotrophin 3 (NT-3) or human neurotrophin 4 (NT-4); inhibiting NGF-dependent chick dorsal root ganglion survival; and/or inhibiting NGF-dependent PC12 cell neurite outgrowth. Preferably, the antibody alleviates pain for a duration of at least about one week to about twelve weeks, or at least about four weeks to about twelve weeks, or at least about eight weeks to about twelve weeks, or at least one week to twelve weeks, or at least four weeks to twelve weeks or at least eight weeks to twelve weeks (or at least one week, or at least four weeks, or at least eight weeks, or at least twelve weeks, or for one to twelve weeks, or for four to twelve weeks, or for eight to twelve weeks) after administration of a single dose the anti-NGF antibody to a subject. Preferably, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, or the antibody comprises a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, or the antibody comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, and a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively. Preferably, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or the antibody comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or the antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or the antibody competes for binding to NGF with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

In various preferred embodiments, the invention provides anti-NGF antibodies having the following features:

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, wherein the antibody has a mean terminal

elimination half-life in humans of at least 10-30 days. Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks).

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days. Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks).

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a human IgG4 constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days. Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks).

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a human IgG4 constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days. Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks).

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days. Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks).

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days. Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks).

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less, and wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days. Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks).

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, wherein the antibody binds to human or rat

NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a human IgG4 constant region, comprising a hinge region mutation, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a human IgG4 constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody binds to

human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a mutation, and wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days. Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks).

An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a mutation and wherein the antibody has a terminal elimination half-life in a cynomolgus monkey of at least 15 days. Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks).

In various embodiments, the anti-NGF antibody of the invention can be, for example, a chimeric, a humanized or a human antibody, or an antibody in which the potential T cell epitopes have been eliminated.

In another aspect, the invention provides a pharmaceutical composition comprising an anti-NGF antibody of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier.

In yet another aspect, the invention provides a method of attenuating or inhibiting an NGF-related disease or condition in a subject, the method comprising administering to the subject an anti-NGF antibody of the invention. Non-limiting examples of NGF-related diseases and conditions include inflammatory pain, post-operative pain, neuropathic pain, fracture pain, gout joint pain, post-herpetic neuralgia, cancer pain, osteoarthritis or rheumatoid arthritis pain, sciatica, pains associated with sickle cell crises, headaches, dysmenorrhea, endometriosis, musculoskeletal pain, chronic low back pain, fibromyalgia, sprains, visceral pain, ovarian cysts, prostatitis, cystitis, interstitial cystitis, incisional pain, migraine, trigeminal neuralgia, pain from burns and/or wounds, pain associated with trauma, pain associated with musculoskeletal diseases, ankylosing spondilitis, periarticular pathologies, pain from bone metastases, pain from HIV, erythromelalgia or pain caused by pancreatitis or kidney stones. Other examples of NGF-related diseases and conditions include malignant melanoma,

Sjogren's syndrome and asthma, such as uncontrolled asthma with severe airway hyper-responsiveness, and intractable cough. Particularly preferred diseases and conditions for treatment according to the methods of the invention include inflammatory pain (particularly osteoarthritis or rheumatoid arthritis pain), musculoskeletal pain (particularly chronic low back pain), neuropathic pain (particularly diabetic neuropathy), cancer pain and pain from bone metastases, interstitial cystitis/ painful bladder syndrome, pain associated with chronic abacterial prostatitis, pain associated with endometriosis and/or uterine fibroids and post-operative pain.

The antibody can be administered, for example, intravenously, subcutaneously (*e.g.*, via an injection pen or subcutaneous implant), intramuscularly or intra-articularly, although other suitable routes of administration are described herein. Preferably, the antibody is administered at a dose in a range of 0.1 mg/kg to 3 mg/kg or at a dose in a range of 0.1 mg/kg to 30 mg/kg. The antibody can be administered, for example, at a dose in a range from about 3 μg/kg to about 3000 μg/kg, with preferred dosages including 100 μg/kg or 300 μg/kg. In other embodiments, the antibody is administered at a dose in a range of 0.1 mg/kg to 30 mg/kg, or in a range of 0.1 mg/kg to 20 mg/kg, or in a range of 0.1 mg/kg to 10 mg/kg, or in a range of 1 mg/kg to 30 mg/kg, or in a range of 1 mg/kg to 20 mg/kg or in a range of 1 mg/kg to 10 mg/kg, although other suitable dosages and dose ranges are described herein. Furthermore, a fixed dose formulation of the antibody can be used.

The antibody can be administered alone or in combination with one or more additional pharmaceutical agents. For example, a second pharmaceutical agent, such as an NSAID, an analgesic (*e.g.*, an opioid analgesic), a local anaesthetic, a nerve block, a phenol block, a therapeutic antibody, an anti-convulsant, an anti-depressant, topical capsaicin, a steroid or an antiviral agent, can be administered in combination with the anti-NGF antibody of the invention. Particularly preferred second pharmaceutical agents for combination treatment with an antibody of the invention include opioid analgesics, such as morphine and the like. Other preferred second pharmaceutical agents for combination treatment include TrkA inhibitors and Protein Kinase C (PKC) inhibitors.

In a preferred embodiment, the invention provides a method of attenuating or inhibiting pain in a subject, the method comprising administering to the subject an anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, and wherein the antibody alleviates pain in the subject for a duration of at least four to twelve weeks (or for at least one to twelve weeks, or for at least eight to twelve weeks, or for four to twelve weeks, or for one to twelve weeks, or for eight to twelve weeks, or for at least one week, or for at least four weeks, or for at least eight weeks, or for at least

twelve weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. Preferably, the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, and a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively. Preferably, the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Preferably, the pain is selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain, pain from bone metastases, interstitial cystitis, painful bladder syndrome, pain associated with chronic abacterial prostatitis, pain associated with endometriosis, pain associated with uterine fibroids and post-operative pain. Preferably, the anti-NGF antibody is administered at a dose in a range from 0.1 to 3 mg/kg or at a dose in a range from 0.1 mg/kg to 30 mg/kg. Preferably, the antibody is administered intravenously or subcutaneously. Preferably, the antibody has a terminal elimination half-life in a human of at least 10-30 days (or at least 10 days, or at least 15 days, or at least 20 days, or at least 25 days, or at least 30 days or in a range of about 10 days to about 40 days or in range of about 15 to about 30 days, or in a range of 10 to 40 days or in range of 15 to 30 days).

In another preferred embodiment, the invention provides a method of attenuating or inhibiting a nerve growth factor (NGF)-related disease or condition in a subject such that a rebound effect is avoided in the subject, the method comprising administering to the subject an anti-NGF antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a hinge region mutation, and wherein the antibody has a terminal elimination half-life in a human of at least 10-30 days (or at least 10 days, or at least 15 days, or at least 20 days, or at least 25 days, or at least 30 days or in a range of about 10 days to about 40 days or in range of about 15 to about 30 days, or in a range of 10 to 40 days or in range of 15 to 30 days), and wherein the antibody is administered at a dosage and at a frequency such that a rebound effect is avoided in the subject. Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks). Preferably, the human IgG4 constant region comprises a mutation at the amino acid position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9. Preferably, the serine at the amino acid position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 is mutated to proline. Preferably, the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ

ID NO: 10. Preferably, the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, and a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively. Preferably, the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Preferably, the antibody competes for binding to NGF with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Preferably, the NGF-related disease or condition is pain selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain, pain from bone metastases, interstitial cystitis, painful bladder syndrome, pain associated with chronic abacterial prostatitis, pain associated with endometriosis, pain associated with uterine fibroids and post-operative pain. Preferably, the anti-NGF antibody is administered at a dose in a range from 0.1 to 3 mg/kg or in a range from 0.1 mg/kg to 30 mg/kg. Preferably, the antibody is administered intravenously or subcutaneously.

In another aspect, the invention provides for the use of the anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for use to attenuate or inhibit an NGF-related disease or condition in a subject. Non-limiting examples of NGF-related diseases and conditions include those set forth above. A preferred NGF-related disease or condition is pain. Preferably, the pain is selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain, pain from bone metastases, interstitial cystitis, painful bladder syndrome, pain associated with chronic abacterial prostatitis, pain associated with endometriosis, pain associated with uterine fibroids and post-operative pain.

In another aspect, the invention provides for use of the anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for use to attenuate or inhibit pain in a subject, such that pain is attenuated or inhibited in the subject for a duration of at least about one week to about twelve weeks, or at least about four weeks to about twelve weeks, or at least about eight weeks to about twelve weeks (or for a duration of one to twelve weeks, or four to twelve weeks, or eight to twelve weeks, or at least one week, or at least two weeks, or at least four weeks, or at least eight weeks, or at least twelve weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject.

In another aspect, the invention provides for use of the anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for use to attenuate or inhibit an NGF-related disease or condition in a subject such that a rebound effect is avoided in the

subject. In particular, the antibody is administered at a dosage and at a frequency such that a rebound effect is avoided in the subject.

In still other aspects, the invention provides nucleic acid molecules encoding the heavy chains and/or light chains of the anti-NGF antibodies of the invention, as well as vectors (*e.g.*, expression vectors) comprising such vectors, host cells comprising such vectors and methods for expressing the anti-NGF antibodies using the host cells of the invention.

In another aspect, the invention provides a method of attenuating or inhibiting a nerve growth factor (NGF)-related disease or condition in a subject such that a rebound effect is avoided in the subject. The method comprises administering to the subject an anti-NGF antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a mutation (preferably a hinge region mutation) and wherein the antibody has a terminal elimination half-life in a cynomolgus monkey of at least 15 days, more preferably of at least 21 days, and wherein the antibody is administered at a dosage and at a frequency such that a rebound effect is avoided in the subject. In another embodiment, the antibody has a terminal elimination half-life in a cynomolgus monkey in a range of about 15 days to about 22 days (or 15-22 days), or a range of about 15 days to about 28 days (or 15-28 days), or in a range of about 21 days to about 28 days (or 21-28 days). In another embodiment, the antibody has a terminal elimination half-life in a rat of at least 8 days. In yet another embodiment, the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days (or at least 10 days, or at least 15 days, or at least 20 days, or at least 25 days, or at least 30 days, or in a range of about 10 days to about 40 days, or in a range of about 15 to about 30 days, or in a range of 10-40 days or in a range of 15-30 days). Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks). Preferred mutations include those described above. Preferred antibodies include those having the sequences and/or the additional functional properties as described above. Non-limiting examples of NGF-related diseases and conditions include those set forth above.

The invention also provides for the use of the anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for use to attenuate or inhibit an NGF-related disease or condition in a subject such that a rebound effect is avoided in the subject.

Kits comprising an anti-NGF antibody of the invention are also provided herein. For example, a kit may comprise anti-NGF antibody and instructions for use of the antibody in treating an NGF-related disease or condition.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a graph showing the binding of PG110 to human nerve growth factor (NGF) but not to human brain derived neurotrophic factor (BDNF), human neurotrophin 3 (NT-3) or human neurotrophin 4 (NT-4), as determined by ELISA.

Figure 2A is a graph showing inhibition of binding of NGF to the TrkA receptor by the PG110 antibody, as determined by a radiolabeled ligand binding experiment.

Figure 2B is a graph showing inhibition of binding of NGF to the $p75^{NTR}$ receptor by the PG110 antibody, as determined by a radiolabeled ligand binding experiment.

Figure 3A is a graph showing the inhibitory effect of PG110 antibody on TF-1 cell proliferation stimulated by human NGF.

Figure 3B is a graph showing the inhibitory effect of PG110 antibody on TF-1 cell proliferation stimulated by rat NGF.

Figure 3C is a graph showing the inhibitory effect of PG110 antibody on TF-1 cell proliferation stimulated by mouse NGF.

Figure 4 is a graph showing the effect of PG110 antibody treatment on skin lesioning in rats.

Detailed Description of the Invention

The invention pertains to anti-nerve growth factor antibodies that exhibit enhanced *in vivo* stability, as evidenced by, for example, an unexpectedly long terminal elimination half life in cynomolgus monkeys. The antibodies of the invention include a modification of the human IgG4 constant region of the antibody, by introduction of a mutation into the IgG4 constant region, preferably into the hinge region of the constant region.

In order that the present invention may be more readily understood, certain terms are first defined. Additional definitions are set forth throughout the detailed description.

I. Definitions

The terms "nerve growth factor" or "NGF" are used interchangeably herein and includes variants, isoforms, homologs, orthologs and paralogs. For example, an antibody specific for human NGF may, in certain cases, cross-react with NGF from species other than human. In other embodiments, an antibody specific for human NGF may be completely specific for human NGF and may not exhibit species or other types of cross-reactivity. The term "human NGF" refers to human sequence NGF, such as comprising the amino acid sequence of human NGF-β chain, the precursor form of

which has Genbank accession number NP_002497, encoded by the nucleotide sequence of Genbank accession number NM_002506. The human NGF-β chain sequence may differ from human NGF-β of Genbank Accession No. NP_002497 by having, for example, conserved substitutions or substitutions in non-conserved regions wherein the human NGF-β has substantially the same biological function as the human NGF-β of Genbank Accession No. NP_002497. The term "rat NGF" refers to rat sequence NGF, such as comprising the amino acid sequence of rat NGF-β chain, the precursor form of which has Genbank accession number XP_227525, encoded by the nucleotide sequence of Genbank accession number XP_227525. The term "mouse NGF" refers to rat sequence NGF, such as comprising the amino acid sequence of mouse NGF-β chain, the precursor form of which has Genbank accession number NP_038637, encoded by the nucleotide sequence of Genbank accession number NM_013609.

The term "TrkA receptor", as used herein, refers to an NGF receptor also known in the art as tropomyosin kinase receptor A and neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 (NTRK1). Exemplary, non-limiting sequences for human TrkA receptor include the amino acid sequences of Genbank accession number NP_001012331 (isoform 1), NP_002520 (isoform 2) and NP_001007793 (isoform 3).

The term "$p75^{NTR}$ receptor", as used herein refers to a neurotrophin receptor, with a molecular weight of approximately 75 kDa, that binds NGF and other neurotrophins, which receptor is described in, *e.g.*, Bothwell, M. (1996) *Science* 272:506-507. An exemplary, non-limiting sequence for human $p75^{NTR}$ receptor is the amino acid sequence of Genbank accession number NP_002498, encoded by the nucleotide sequence of Genbank accession number NM_002507.

The term "terminal elimination half life", as used herein with regard to the anti-NGF antibodies, refers to the amount of time needed for the concentration of the antibody, as measured in the serum of a subject to which the antibody has been administered, to be reduced by half once both absorption and redistribution of the antibody are complete. When a group of subjects is used, the geometric mean of the terminal elimination half life in the subjects can be used as the measure of the terminal elimination half life of the antibody.

The term "pharmacologic half life", as used herein with regard to the anti-NGF antibodies, refers to the average amount of time to maintain drug effect *in vivo* (MRT for drug effect). It can be calculated as the ratio of area of the first moment baseline-corrected effect-time curve (AUMEC) vs. accumulated baseline-corrected drug effect over time (area under the effect-time curve, AUEC), using the following formula:

$$\text{Pharmacolo gic Half- life} = \frac{\text{AUMEC}}{\text{AUEC}} = \frac{\int E(t)tdt}{\int E(t)dt}$$

When a group of subjects is used, the geometric mean of the pharmacologic half life in the subjects can be used as the measure of the pharmacologic half life of the antibody.

The term "hinge region mutation", as used herein, refers to a mutation, such as a point mutation, substitution, addition or deletion, in the hinge region of an immunoglobulin constant domain.

The term "inhibition" as used herein, refers to any statistically significant decrease in biological activity, including full blocking of the activity. For example, "inhibition" can refer to a decrease of about 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, or 100% in biological activity.

The term "antibody" or "immunoglobulin," as used interchangeably herein, includes whole antibodies and any antigen binding fragment (*i.e.*, "antigen-binding portion") or single chains thereof that retains the enhanced *in vivo* stability described herein. An "antibody" comprises at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as V_H) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and CH3. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as V_L) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The V_H and V_L regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each V_H and V_L is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (*e.g.*, effector cells) and the first component (Clq) of the classical complement system.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. Monoclonal antibodies can be prepared using any art recognized technique, for example, a hybridoma method, as described by Kohler *et al.* (1975) *Nature*, 256:495, a transgenic animal, as described by,

for example, (see *e.g.*, Lonberg, *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859), recombinant DNA methods (see, *e.g.*, U.S. Pat. No. 4,816,567), or using phage antibody libraries using the techniques described in, for example, Clarkson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). Monoclonal antibodies include chimeric antibodies, human antibodies and humanized antibodies and may occur naturally or be recombinantly produced.

The term "recombinant antibody," refers to antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as (a) antibodies isolated from an animal (*e.g.*, a mouse) that is transgenic or transchromosomal for immunoglobulin genes (*e.g.*, human immunoglobulin genes) or a hybridoma prepared therefrom, (b) antibodies isolated from a host cell transformed to express the antibody, *e.g.*, from a transfectoma, (c) antibodies isolated from a recombinant, combinatorial antibody library (*e.g.*, containing human antibody sequences) using phage display, and (d) antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve splicing of immunoglobulin gene sequences (*e.g.*, human immunoglobulin genes) to other DNA sequences. Such recombinant antibodies may have variable and constant regions derived from human germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies can be subjected to *in vitro* mutagenesis and thus the amino acid sequences of the V_H and V_L regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human germline V_H and V_L sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*.

The term "chimeric immunoglobulin" or antibody refers to an immunoglobulin or antibody whose variable regions derive from a first species and whose constant regions derive from a second species. Chimeric immunoglobulins or antibodies can be constructed, for example by genetic engineering, from immunoglobulin gene segments belonging to different species.

The term "humanized antibody" or "humanized immunoglobulin" refers to an antibody or immunoglobulin that includes at least one humanized antibody or immunoglobulin chain (*i.e.*, at least one humanized light or heavy chain). The term "humanized immunoglobulin chain" or "humanized antibody chain" (*i.e.*, a "humanized immunoglobulin light chain" or "humanized immunoglobulin heavy chain") refers to an immunoglobulin or antibody chain (*i.e.*, a light or heavy chain, respectively) having a variable region that includes a variable framework region substantially from a human immunoglobulin or antibody and complementarity determining regions (CDRs) (*e.g.*, at least one CDR, preferably two CDRs, more preferably three CDRs) substantially from a non-human immunoglobulin or antibody, and further includes constant regions (*e.g.*, at least one constant region or portion thereof, in the case of a light chain, and preferably

three constant regions in the case of a heavy chain). The term "humanized variable region" (*e.g.*, "humanized light chain variable region" or "humanized heavy chain variable region") refers to a variable region that includes a variable framework region substantially from a human immunoglobulin or antibody and complementarity determining regions (CDRs) substantially from a non-human immunoglobulin or antibody.

The term "human antibody," as used herein, is intended to include antibodies having variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences as described, for example, by Kabat et al. (See Kabat, *et al.* (1991) *Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Furthermore, if the antibody contains a constant region, the constant region also is derived from human germline immunoglobulin sequences. The human antibodies may include amino acid residues not encoded by human germline immunoglobulin sequences (*e.g.*, mutations introduced by random or site-specific mutagenesis *in vitro* or by somatic mutation *in vivo*). However, the term "human antibody", as used herein, is not intended to include antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences.

An "isolated antibody," as used herein, is intended to refer to an antibody which is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (*e.g.*, an isolated antibody that specifically binds to NGF is substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than NGF). In addition, an isolated antibody is typically substantially free of other cellular material and/or chemicals.

As used herein, the terms "specific binding," "specifically binds," "selective binding," and "selectively binds," mean that an antibody or antigen-binding portion thereof, exhibits appreciable affinity for a particular antigen or epitope and, generally, does not exhibit significant cross-reactivity with other antigens and epitopes. "Appreciable" or preferred binding includes binding with an affinity of at least 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 M^{-1}, or 10^{10} M^{-1}. Affinities greater than 10^7 M^{-1}, preferably greater than 10^8 M^{-1} are more preferred. Values intermediate of those set forth herein are also intended to be within the scope of the present invention and a preferred binding affinity can be indicated as a range of affinities, for example, 10^6 to 10^{10} M^{-1}, preferably 10^7 to 10^{10} M^{-1}, more preferably 10^8 to 10^{10} M^{-1}. An antibody that "does not exhibit significant cross-reactivity" is one that will not appreciably bind to an undesirable entity (*e.g.*, an undesirable proteinaceous entity). Specific or selective binding can be determined according to any art-recognized means for determining such binding, including, for example, according to Scatchard analysis and/or competitive binding assays.

The term "K_D," as used herein, is intended to refer to the dissociation equilibrium constant of a particular antibody-antigen interaction or the affinity of an antibody for an antigen. In one embodiment, the antibody according to the present invention binds an antigen (*e.g.*, NGF) with an affinity (K_D) of about 100 pM or less (*i.e.*, or better) (*e.g.*, about 90 pM or about 80 pM or about 70 pM or about 60 pM or about 50 pM or about 40 pM or about 30 pM), as measured using a surface plasmon resonance assay or a cell binding assay. In a preferred embodiment, the antibody binds NGF with an affinity (K_D) in a range of about 25-35 pM.

The term "K_{ass}", as used herein, is intended to refer to the association rate constant for the association of an antibody into the antibody/antigen complex.

The term "K_{diss}", as used herein, is intended to refer to the dissociation rate constant for the dissociation of an antibody from the antibody/antigen complex.

The term "IC_{50}", as used herein, refers to the concentration of an antibody that inhibits a response, either in an *in vitro* or an *in vivo* assay, to a level that is 50% of the maximal inhibitory response, *i.e.*, halfway between the maximal inhibitory response and the untreated response.

The term "nucleic acid molecule," as used herein, is intended to include DNA molecules and RNA molecules. A nucleic acid molecule may be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA. The term "isolated nucleic acid molecule," as used herein in reference to nucleic acids encoding antibodies or antibody portions (*e.g.*, V_H, V_L, CDR3) that bind to NGF, is intended to refer to a nucleic acid molecule in which the nucleotide sequences encoding the antibody or antibody portion are free of other nucleotide sequences encoding antibodies that bind antigens other than NGF, which other sequences may naturally flank the nucleic acid in human genomic DNA.

The term "operably linked" refers to a nucleic acid sequence placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a signal sequence or secretory leader sequence is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice. A nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For instance, a

promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence. With respect to transcription regulatory sequences, operably linked means that the DNA sequences being linked are contiguous and, where necessary to join two protein coding regions, contiguous and in reading frame. For switch sequences, operably linked indicates that the sequences are capable of effecting switch recombination.

The term "vector," as used herein, is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid," which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (*e.g.*, bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (*e.g.*, non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors"(or simply, "expression vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. The terms, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (*e.g.*, replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

The term "recombinant host cell" (or simply "host cell"), as used herein, is intended to refer to a cell into which a recombinant expression vector has been introduced. It should be understood that such terms are intended to refer not only to the particular subject cell but to the progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term "host cell" as used herein.

The terms "treat," "treating," and "treatment," as used herein, refer to therapeutic or preventative measures described herein. The methods of "treatment" employ administration, to a subject, of an antibody of the present invention, for example, a subject having an NGF-related disease or condition, in order to prevent, cure, delay, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of the disease or condition.

The term "NGF-related disease or condition", as used herein, refers to diseases and conditions in which NGF activity is involved with, or associated with, or mediates or promotes one or more symptoms of the disease or condition.

As used herein, the term "subject" includes any human or non-human animal. In a particular embodiment, the subject is a human. The term "non-human animal" includes all vertebrates, *e.g.*, mammals and non-mammals, such as non-human primates, sheep, dog, cow, chickens, amphibians, reptiles, *etc.*

As used herein, the term "rebound effect" refers to diminished efficacy of NGF sequestering agents, such as an anti-NGF antibody, occurring in a subject after an initial period of effectiveness after single or repeat administration. For example, treatment with an anti-NGF antibody may initially relieve pain, *e.g.* due to inflammation or nerve damage or other ethiology, which is then followed by a period of diminished analgesic efficacy in which pain eventually becomes about as intense or more intense than before treatment. In another example, an anti-NGF antibody may exhibit an initial effectiveness in a subject for a period of time after single or repeat administration, such as a period of one week after administration (*e.g.*, days 1-7 after administration), which is then followed by a period of diminished efficacy, such as for a period from 1-2 weeks after administration (*e.g.*, days 7-14 after administration). This "rebound" period may be followed by a period of recovery of efficacy of the anti-NGF antibody. For example, there can be a biphasic profile of analgesia after single or repeat administration of an anti-NGF antibody, with an intermediate period of reduced efficacy or even exaggerated pain sensation. This rebound effect can be assessed in, for example, clinical pain studies, experimental models of pain and/or other models of anti-NGF efficacy. This rebound effect can be associated with, for example, increased pain in the subject and/or increased adverse events (such as abnormal sensations, ranging from allodynia to dysesthesia, paresthesia and hyper- or hypoesthesia) during the rebound period. Although not intending to be limited by mechanism, the rebound effect may be caused by altered NGF expression, altered TrkA or p75 receptor expression or signaling or any other mechanism that results in transient diminished efficacy after single or repeat administration of an anti-NGF after an initial period of efficacy.

Various aspects of the invention are described in further detail in the following subsections.

II. Antibodies of the Invention

A. Enhanced *In Vivo* Stability

The anti-NGF antibodies of the invention are characterized by having enhanced *in vivo* stability, as evidenced by the long terminal elimination half life observed *in vivo*. Although not intending to be limited by mechanism, it is thought that the extended

terminal elimination half life of the antibody results from a reduced clearance rate of the antibody rather than from an increase in the distribution volume of the antibody. The antibodies of the invention comprise a human IgG4 constant region that comprises a mutation. A preferred mutation is a hinge region mutation. Preferably, the hinge region mutation comprises mutation of serine at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 (wherein SEQ ID NO: 9 shows the amino acid sequence of the wild-type human IgG4 constant region). More preferably, the hinge region mutation comprises mutation of the serine at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 to proline. In a preferred embodiment, the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10.

An anti-NGF antibody of the invention exhibits an unexpectedly long terminal elimination half life, such as a terminal elimination half life in a cynomolgus monkey of at least 15 days and typically in the range of about 15 to about 22 days (or in a range of 15-22 days), or in a range of about 15 days to about 28 days (or in a range of 15-28 days) or in a range of about 21 days to about 28 days (or in a range of 21-28 days). This stabilized anti-NGF antibody also exhibits a terminal elimination half life in rats of at least 8 days, typically in the range of about 8 to about 9 days (or in a range of 8-9 days). As described in detail in Example 4, PG110, an anti-NGF antibody of the invention, exhibits a mean terminal elimination half life in cynomolgus monkeys of at least 15 days and typically longer. For example, in one cynomolgus monkey study, a mean terminal elimination half life in a range of about 15 to about 22 days was observed. In another cynomolgus monkey study, a mean terminal elimination half life in a range of about 21 to about 28 days was observed. Furthermore, PG110 exhibits a mean terminal elimination half life in rats of about 8 to about 9 days. Still further, as it is known in the art that the terminal elimination half life of IgG in humans is about twice that of monkeys, it is predicted that the anti-NGF antibodies of the invention, such as PG110, will have terminal elimination half life in humans of at least 10-30 days, or at least 10 days, or at least 15 days, or at least 20 days, or at least 25 days, or more preferably at least 30 days or at least 40 days, or in a range of about 10 days to about 40 days (or in range of 10-40 days) or in a range of about 15 to about 30 days (or in a range of 15-30 days). Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks). As described further in Example 8, an anti-NGF antibody of the invention of the invention has been shown to have a mean pharmacologic half life in humans in the aforementioned ranges.

The terminal elimination half life for PG110 in cynomolgus monkeys is considerably longer than the half life that has been reported in the art for other IgG4 antibodies in cynomolgus monkeys. For example, a half life of about 40-90 hours (about 1.6-3.8 days) in cynomolgus monkeys has been reported for CDP571, an IgG4 anti-TNF antibody (see Stephens, S. *et al.* (1995) *Immunol.* 85:668-674). Similarly, a half life of about 3 days in cynomolgus monkeys has been reported for natalizumab, an IgG4 anti-integrin antibody (see Refusal CHMP Assessment Report for Natalizumab, European Medicines Agency, London, 15 November 2007, Doc. Ref. EMEA/CHMP/8203/2008).

A preferred hinge region mutation used in the invention is a serine to proline mutation at position 108 in SEQ ID NO: 9. This mutation has been previously described in the art (see Angal, S. *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-108) and reported to abolish the heterogeneity of IgG4 molecules, in particular the formation of half antibodies containing a single heavy chain and a single light chain. Accordingly, substitution of an amino acid other than proline at position 108 of SEQ ID NO: 9 also is encompassed by the invention, wherein the substitution achieves the same effect as the Ser to Pro mutation in eliminating the heterogeneity of the IgG4 molecule (*e.g.*, the formation of half antibodies). The ability of a mutation at position 108 to eliminate the heterogeneity of the IgG4 molecule can be assessed as described in Angal *et al.* (1993), *supra.*

In addition to, or alternative to, the modification at position 108 of SEQ ID NO: 9, other IgG hinge region mutations have been described that improve the affinity of the FcRn-IgG interaction, resulting in an extended half life for the modified IgG. Examples of such additional or alternative modifications include mutations at one or more IgG constant region residues corresponding to: Thr250, Met252, Ser254, Thr256, Thr307, Glu308, Met428, His433 and/or Asn434 (as described further in Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604; Petkova, S.B. *et al.* (2006) *Int. Immunol.* 18:1759-1769; Hinton, P.R. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279:6213-6216; Kamei, D.T. *et al.* (2005) *Biotechnol. Bioeng.* 92:748-760; Vaccaro, C. *et al.* (2005) *Nature Biotechnol.* 23:1283-1288; Hinton, P.R. *et al.* (2006) *J. Immunol.* 176:346-356).

Still further, alternative to hinge region mutations, other stabilizing modifications of the IgG4 constant region have been described. For example, in other embodiments, the mutation of the human IgG4 constant region comprises substitution of the IgG4 CH3 region with an IgG1 CH3 region, substitution of the IgG4 CH2 and CH3 regions with the IgG1 CH2 and CH3 regions or substitution of the arginine at position 409 of the IgG4 constant region (according to Kabat numbering) with a lysine, as described further in U.S. Patent Publication 20080063635. In yet other embodiments, the mutation of the human IgG4 constant region comprises substitution of Arg409, Phe405 or Lys370 (according to Kabat numbering), such as substitution of Arg409 with Lys, Ala, Thr, Met

or Leu, or substitution of Phe405 with Ala, Val, Gly or Leu, as described further in PCT Publication WO 2008/145142.

A desired mutation can be introduced into the human IgG4 constant region domain using standard recombinant DNA techniques, such as site-directed mutagenesis or PCR-mediated mutagenesis of a nucleic acid encoding the human IgG4 constant region. Furthermore, DNA encoding an antibody heavy chain variable region can be introduced into an expression vector encoding a mutated human IgG4 constant region such that the variable region and constant region become operatively linked, to thereby create vector encoding a full-length immunoglobulin heavy chain in which the constant region is a mutated human IgG4 constant region. The expression vector then can be used to express the full-length immunoglobulin heavy chain using standard recombinant protein expression methods. For example, an anti-NGF antibody of the invention can be constructed as described in further detail in Example 1.

The terminal elimination half life of an antibody can be determined using standard methods known in the art. For example, after administration of the antibody to a subject (*e.g.*, a cynomolgus monkey, a Sprague-Dawley rat), blood samples can be obtained at various time points after administration and the concentration of antibody in the serum from the blood samples can be determined using a technique known in the art for determining antibody concentration (such as an ELISA assay). Calculation of the terminal half life of the antibody can be accomplished using known pharmacokinetic methods, for example using a computer system and software designed to calculate pharmacokinetic parameters (a non-limiting example of which is the SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System with WinNonlin software).

B. Antibody Variable Regions.

Preferred antibody variable regions for use in the anti-NGF antibody of the invention are the heavy and light chain variable regions of the PG110 antibody. The heavy chain variable region of PG110 is shown in SEQ ID NO: 1 and the light chain variable region of PG110 is shown in SEQ ID NO: 2. Accordingly, in one embodiment, the anti-NGF antibody of the invention comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1. In another embodiment, the anti-NGF antibody of the invention comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. In yet another embodiment, the anti-NGF antibody of the invention comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

The full-length amino acid sequence of the PG110 heavy chain (variable and constant regions) is shown in SEQ ID NO: 13. This heavy chain can be prepared from a precursor heavy chain, which includes a leader or signal sequence, such as the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12. The precursor heavy chain of SEQ ID NO: 12 is encoded by the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 11.

The full-length amino acid sequence of the PG110 light chain (variable and constant regions) is shown in SEQ ID NO: 16. This light chain can be prepared from a precursor light chain, which includes a leader or signal sequence, such as the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 15. The precursor light chain of SEQ ID NO: 15 is encoded by the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO: 14.

Accordingly, in another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody comprising a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13, wherein the antibody has a serum half-life in a cynomolgus monkey of at least 15 days. In another embodiment, the serum half-life in a cynomolgus monkey can be in a range of about 15 days to about 22 days (or in a range of 15-22 days). In other embodiments, the serum half-life in a rat can be at least 8 days or in a range of about 8 days to about 9 days (or in a range of 8-9 days). In yet other embodiments, the serum half-life in a human can be at least 10-30 days, or at least 10 days, or at least 15 days, or at least 20 days, or at least 25 days, or at least 30 days or at least 40 days or in a range of about 10 days to about 40 days (or in a range of 10-40 days) or in a range of about 15 to about 30 days (or in a range of 15-30 days). Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks). Preferably, the heavy chain is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11. Preferably, the light chain of the antibody comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16. Preferably, the light chain is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 14.

In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody comprising a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 and a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16.

In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody comprising a heavy chain encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11. and a light chain encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 14.

Given that the binding specificity of PG110 is provided by the complementarity determining regions (CDRs) of the variable domain, in another embodiment, an anti-NGF antibody of the invention comprises the CDRs of the heavy chain of PG110, the

light chain of PG110 or both. The heavy chain CDRs 1, 2 and 3 of PG110 are shown in SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively. The light chain CDRs 1, 2 and 3 of PG110 are shown in SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively. Accordingly, in one embodiment, the anti-NGF antibody of the invention comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively. In another embodiment, the anti-NGF antibody of the invention comprises a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively. In yet another embodiment, the anti-NGF antibody of the invention comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, and comprises a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively.

In yet another embodiment, an anti-NGF antibody of the invention can comprise heavy and light chain variable regions comprising amino acid sequences that are homologous to the heavy and/or light chain variable regions of PG110, and wherein the antibodies retain the enhanced *in vivo* stability exhibited by PG110. For example, the heavy chain variable region of the anti-NGF antibody can comprise an amino acid sequence that is at least 90% homologous, more preferably at least 95% homologous, more preferably at least 97% homologous and even more preferably at least 99% homologous to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1. The light chain variable region of the anti-NGF antibody can comprise an amino acid sequence that is at least 90% homologous, more preferably at least 95% homologous, more preferably at least 97% homologous and even more preferably at least 99% homologous to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

As used herein, the percent homology between two amino acid sequences is equivalent to the percent identity between the two sequences. The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (*i.e.*, % homology = # of identical positions/total # of positions x 100), taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences. The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. For example, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4. In addition, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software

package (available at http://www.gcg.com), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

In yet another embodiment, an anti-NGF antibody of the invention can comprise heavy and light chain variable regions comprising the amino acid sequences of the heavy and/or light chain variable regions of PG110 but wherein one or more conservative substitutions have been introduced into the sequence(s) yet the antibody retains the enhanced *in vivo* stability exhibited by PG110. For example, the heavy chain variable region of the anti-NGF antibody can comprise an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 except for 1, 2, 3, 4 or 5 conservative amino acid substitutions as compared to SEQ ID NO: 1. The light chain variable region of the anti-NGF antibody can comprise an amino acid sequence that is identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 except for 1, 2, 3, 4 or 5 conservative amino acid substitutions as compared to SEQ ID NO: 2.

As used herein, the term "conservative amino acid substitution" is intended to refer to amino acid modifications that do not significantly affect or alter the binding or stability characteristics of the antibody containing the amino acid sequence. Such conservative modifications include amino acid substitutions, additions and deletions. Modifications can be introduced into an antibody of this disclosure by standard techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Conservative amino acid substitutions are ones in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine, tryptophan), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, one or more amino acid residues within the variable regions of PG110 can be replaced with other amino acid residues from the same side chain family and the altered antibody can be tested for retained function using the functional assays described herein.

In yet another embodiment, an anti-NGF antibody of the invention comprises antigen-binding regions (*i.e.*, variable regions) that bind to the same epitope on NGF as the PG110 antibody or that cross-compete for binding to NGF with PG110. Accordingly, in one embodiment, the anti-NGF antibody of the invention competes for binding to NGF with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising

the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

Such cross-competing antibodies can be identified based on their ability to cross-compete with PG110 in standard NGF binding assays. For example, standard ELISA assays can be used in which a recombinant NGF protein (*e.g.*, human NGF-β) is immobilized on the plate, one of the antibodies is fluorescently labeled and the ability of non-labeled antibodies to compete off the binding of the labeled antibody is evaluated. Additionally or alternatively, BIAcore analysis can be used to assess the ability of the antibodies to cross-compete. Suitable binding assays that can be used to test the ability of an antibody to compete for binding to NGF with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 are described in further detail in Example 2.

In still other embodiments, an anti-NGF antibody of the invention exhibits one or more functional properties of the PG110 antibody. For example, an anti-NGF antibody of the invention can exhibit one or more of the following functional properties:

a) binds to human NGF but does not bind to human brain-derived neurotrophic factor (BDNF), human neurotrophin 3 (NT-3) or human neurotrophin 4 (NT-4);

b) binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less;

c) inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$;

d) inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells;

e) inhibits NGF-dependent chick dorsal root ganglion survival;

f) inhibits NGF-dependent PC12 cell neurite outgrowth.

These functional properties can be assessed using the *in vitro* assays set forth in detail in Examples 2 and 3. With respect to the specific binding of the antibody to human NGF, as used herein the term "does not bind to brain-derived neurotrophic factor (BDNF), human neurotrophin 3 (NT-3) or human neurotrophin 4 (NT-4)" is intended to mean that the amount of observed binding of the antibody to BDNF, NT-3 or NT-4, in a standard binding assay (*e.g.*, ELISA, or other suitable *in vitro* assay as described in the Examples) is comparable to background levels of binding (*e.g.*, for a control antibody), for example no more than 2-fold above background levels, or less than 5% binding to BDNF, NT-3 or NT-4 as compared to binding to human NGF (wherein the level of binding to human NGF is set as 100% binding).

In yet another embodiment, the invention provides an anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 (or wherein the human IgG4 constant region comprises a mutation of serine at amino acid position 108

of SEQ ID NO: 9, preferably a serine to proline mutation at position 108), and wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less (or, alternatively, with a K_D of 300 pM or less, 200 mP or less, 150 pM or less, 75 pM or less or 50 pM or less), inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less (or, alternatively, with an IC_{50} of 500 pM or less 400 pM or less, 300 pM or less or 200 pM or less), and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less (or, alternatively, with an IC_{50} of 150 ng/ml or less, 100 ng/ml or less, 75 ng/ml or less or 40 ng/ml or less). Preferably, the antibody has mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days, or at least 10 days, or at least 15 days, or at least 20 days, or at least 25 days, or at least 30 days or in a range of about 10 days to about 40 days (or in a range of 10-40 days) or in a range of about 15 days to about 30 days (or in a range of 15-30 days). Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks (or in a range of four to six weeks), or in a range of at least four to seven weeks (or in a range of four to seven weeks) or in a range of at least four to eight weeks (or in a range of four to eight weeks). Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a mean terminal elimination half life in a cynomolgus monkey of at least 15 days and typically in the range of about 15 to about 22 days (or in a range of 15-22 days), or in a range of about 15 days to about 28 days (or in a range of 15-28 days) or in a range of about 21 days to about 28 days (or in a range of 21-28 days). Additionally or alternatively, the antibody may exhibit a terminal elimination half life in rats of at least 8 days, typically in the range of about 8 to about 9 days (or in a range of 8-9 days). The antibody may further exhibit one or more additional functional properties, such as binding to human NGF but not binding to human brain-derived neurotrophic factor (BDNF), human neurotrophin 3 (NT-3) or human neurotrophin 4 (NT-4); inhibiting NGF-dependent chick dorsal root ganglion survival; and/or inhibiting NGF-dependent PC12 cell neurite outgrowth. Preferably, the antibody alleviates pain for a duration of at least about one week to about twelve weeks after administration of a single dose the anti-NGF antibody to a subject. Preferably, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, or the antibody comprises a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, or the antibody comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, and a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively. Preferably, the antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 or the antibody comprises a light

chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or the antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or the antibody competes for binding to NGF with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

In yet another embodiment, the anti-NGF antibody of the invention does not exhibit a rebound effect when administered to a subject (*e.g.*, the antibody is administered at a dosage and at a frequency such that a rebound effect is avoided in the subject). A rebound effect, in which an anti-NGF antibody exhibits diminished efficacy in a subject after an initial period of effectiveness after single or repeat administration, has been reported in both animal models and clinical studies of other anti-NGF antibodies. For example, such an effect, referred to as a "rebound phenomenon", was reported for an anti-rat NGF antibody in a chronic constriction injury (CCI) model in rats (Ro, L-S. *et al.* (1999) *Pain* 79:265-274). Additionally, clinical pain studies with the anti-NGF antibody tanezumab (also known as RN624, E3, CAS Registry No. 880266-57-9) have been reported in which a period of increased adverse events, such as sensitivity to touch and a 'pins & needles' sensation, was observed after an initial analgesic period (see presentation by Hefti, Franz F., Rinat Neuroscience, LSUHSC, Shreveport, Louisiana, September 26, 2006). Although not intending to be limited by mechanism, it is thought that the prolonged terminal elimination half life of the anti-NGF antibodies of the invention allows them to avoid exhibiting a rebound effect. Thus, other advantages of the anti-NGF antibodies of the invention include a more consistent and prolonged activity *in vivo* as compared to other prior art anti-NGF antibodies. Given the prolonged terminal elimination half life of the anti-NGF antibodies of the invention, lower dosages can be used (as compared to other anti-NGF antibodies), and the antibody can be used at more frequent intervals if necessary, such that dosage and timing treatment regimens can be chosen such that a rebound effect in the subject is avoided.

In yet another embodiment, the anti-NGF antibody of the invention is capable of alleviating pain for a long duration in a subject, for example the antibody is capable of alleviating pain for a duration of at least about one week to about twelve weeks (or for one week to twelve weeks), after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In one embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about one week (or at least one week) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In another embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about two weeks (or at least two weeks) after administration of a

single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In another embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about four weeks (or at least four weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In another embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about eight weeks (or at least eight weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In another embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about twelve weeks (or at least twelve weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In another embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about four weeks to about twelve weeks (or for four weeks to twelve weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In another embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about eight weeks to about twelve weeks (or for eight weeks to twelve weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject.

The ability of the antibody to alleviate pain in a subject can be assessed using assays established in the art. Suitable animals models for assessing the duration of pain alleviation by an anti-NGF antibody are described in, for example, PCT Publication No. WO 2006/131951 and U.S. Patent Publication 20080182978. Non-limiting examples of such animal models include a neuropathic pain model evoked by chronic constriction of the sciatic nerve, a post-surgical pain model involving incision of the hind paw, a rheumatoid arthritis pain model involving complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis and cancer pain models such as described in Halvorson, K.G. *et al.* (2005) *Cancer Res.* 65:9426-9435 and Sevcik, M.A. *et al.* (2005) *Pain* 115:128-141. Furthermore, pain alleviation can be evaluated clinically in humans and the duration of pain alleviation can be determined based on pain levels reported by the human subject(s) being treated with the anti-NGF antibody.

In yet other embodiments, an anti-NGF antibody of the invention can comprise a heavy chain variable region and/or light chain variable region of an anti-NGF antibody described in the art. For example, a heavy chain variable region and/or light chain variable region of an anti-NGF antibody as described in PCT Publication No. WO 2001/78698, PCT Publication No. WO 2001/64247, PCT Publication No. WO 2002/096458, PCT Publication No. WO 2004/032870, PCT Publication No. WO 2004/058184, PCT Publication No. WO 2005/061540, PCT Publication No. WO 2005/019266, PCT Publication No. WO 2006/077441, PCT Publication No. WO 2006/131951, PCT Publication No. WO 2006/110883, PCT Publication No. WO 2009/023540, U.S. Patent No. 7,449,616; U.S. Publication No. US 20050074821, U.S. Publication No. US 20080033157, U.S. Publication No. US 20080182978 or U.S. Publication No. US 20090041717 can be used in an anti-NGF antibody of the invention.

In yet other embodiments, an anti-NGF antibody of the invention can comprise a heavy chain variable region and/or light chain variable region of an anti-NGF antibody that is prepared by a standard method known in the art for raising monoclonal antibodies; such as the standard somatic cell hybridization technique described by Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495 to create non-human monoclonal antibodies (which antibodies can then be humanized), as well as phage display library techniques or methods using transgenic animals expressing human immunoglobulin genes. Phage display library techniques for selecting antibodies are described in, for example, McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990), Clarkson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991), Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) and Hoet *et al* (2005) *Nature Biotechnology* 23, 344-348 ; U.S. Patent Nos. 5,223,409; 5,403,484; and 5,571,698 to Ladner *et al.*; U.S. Patent Nos. 5,427,908 and 5,580,717 to Dower *et al.*; U.S. Patent Nos. 5,969,108 and 6,172,197 to McCafferty *et al.*; and U.S. Patent Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 and 6,593,081 to Griffiths *et al.*. Methods of using transgenic animals expressing human immunoglobulin genes to raise antibodies are described in, for example, Lonberg, *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546; U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; and 5,770,429; all to Lonberg and Kay; U.S. Patent No. 5,545,807 to Surani *et al.*; PCT Publication Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 and WO 99/45962, all to Lonberg and Kay; PCT Publication WO 02/43478 to Ishida *et al.*, U.S. Patent Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 and 6,162,963 to Kucherlapati *et al.*

In various embodiments, an anti-NGF antibody of the invention can be a chimeric antibody, a humanized antibody or a human antibody. Furthermore, the antibody can be one in which potential T cell epitopes have been eliminated. Methods of eliminating potential T cell epitopes to thereby reduce the potential immunogenicity of an antibody have been described in the art (see e.g., U.S. Patent Publication No. 20030153043 by Carr *et al.*).

An antibody or antibody portion of the invention can be derivatized or linked to another functional molecule (*e.g.*, another peptide or protein). Accordingly, the antibodies and antibody portions of the invention are intended to include derivatized and otherwise modified forms of the PG110 antibodies described herein. For example, an antibody or antibody portion of the invention can be functionally linked (by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other molecular entities, such as another antibody (*e.g.*, a bispecific antibody or a diabody), a detectable agent, a cytotoxic agent, a pharmaceutical agent, and/or a protein or peptide

that can mediate associate of the antibody or antibody portion with another molecule (such as a streptavidin core region or a polyhistidine tag).

One type of derivatized antibody is produced by crosslinking two or more antibodies (of the same type or of different types, *e.g.*, to create bispecific antibodies). Suitable crosslinkers include those that are heterobifunctional, having two distinctly reactive groups separated by an appropriate spacer (*e.g.*, m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) or homobifunctional (*e.g.*, disuccinimidyl suberate). Such linkers are available from Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Useful detectable agents with which an antibody or antibody portion of the invention may be derivatized include fluorescent compounds. Exemplary fluorescent detectable agents include fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, 5-dimethylamine-1-napthalenesulfonyl chloride, phycoerythrin and the like. An antibody may also be derivatized with detectable enzymes, such as alkaline phosphatase, horseradish peroxidase, glucose oxidase and the like. When an antibody is derivatized with a detectable enzyme, it is detected by adding additional reagents that the enzyme uses to produce a detectable reaction product. For example, when the detectable agent horseradish peroxidase is present, the addition of hydrogen peroxide and diaminobenzidine leads to a colored reaction product, which is detectable. An antibody may also be derivatized with biotin, and detected through indirect measurement of avidin or streptavidin binding.

III. Antibody Production

Another aspect of this disclosure pertains to nucleic acid molecules that encode the antibodies of this disclosure. The nucleic acids may be present in whole cells, in a cell lysate, or in a partially purified or substantially pure form. A nucleic acid is "isolated" or "rendered substantially pure" when purified away from other cellular components or other contaminants, *e.g.*, other cellular nucleic acids or proteins, by standard techniques, including alkaline/SDS treatment, CsCl banding, column chromatography, agarose gel electrophoresis and others well known in the art. *See*, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. A nucleic acid of this disclosure can be, for example, DNA or RNA and may or may not contain intronic sequences. In a preferred embodiment, the nucleic acid is a cDNA molecule. Nucleic acids of this disclosure can be obtained using standard molecular biology techniques.

A preferred nucleic acid molecule of the invention comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11. Another preferred nucleic acid molecule of the invention comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 14.

Once DNA fragments encoding V_H and V_L segments are obtained, these DNA fragments can be further manipulated by standard recombinant DNA techniques, for example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes such that the variable region is operatively linked to the constant region (see *e.g.*, Example 1). The term "operatively linked", as used in this context, is intended to mean that the two DNA fragments are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA fragments remain in-frame.

Antibodies can be produced in a host cell using methods known in the art (*e.g.*, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202). For example, to express the antibodies, the DNAs encoding the heavy and light chains can be inserted into expression vectors such that the genes are operatively linked to transcriptional and translational control sequences. In this context, the term "operatively linked" is intended to mean that an antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene. The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into separate vector or, more typically, both genes are inserted into the same expression vector. The antibody genes are inserted into the expression vector by standard methods (*e.g.*, ligation of complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present). Additionally, the recombinant expression vector can encode a signal peptide that facilitates secretion of the antibody chain from a host cell. The antibody chain gene can be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in-frame to the amino terminus of the antibody chain gene. The signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (*i.e.*, a signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

In addition to the antibody chain genes, the recombinant expression vectors of typically carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain genes in a host cell. The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (*e.g.*, polyadenylation signals) that control the transcription or translation of the antibody chain genes. Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences, may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, etc. Preferred regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or

enhancers derived from cytomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus, (*e.g.*, the adenovirus major late promoter (AdMLP) and polyoma. Alternatively, nonviral regulatory sequences may be used, such as the ubiquitin promoter or β-globin promoter. Still further, regulatory elements composed of sequences from different sources, such as the SRα promoter system, which contains sequences from the SV40 early promoter and the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

In addition to the antibody chain genes and regulatory sequences, the recombinant expression vectors may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (*e.g.*, origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see, *e.g.*, U.S. Pat. Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017, all by Axel *et al.*). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Preferred selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr- host cells with methotrexate selection/amplification) and the neo gene (for G418 selection).

For expression of the light and heavy chains, the expression vector(s) encoding the heavy and light chains is transfected into a host cell by standard techniques. The various forms of the term "transfection" are intended to encompass a wide variety of techniques commonly used for the introduction of exogenous DNA into a prokaryotic or eukaryotic host cell, *e.g.*, electroporation, calcium-phosphate precipitation, DEAE-dextran transfection and the like. Although it is theoretically possible to express the antibodies in either prokaryotic or eukaryotic host cells, expression of antibodies in eukaryotic cells, and most preferably mammalian host cells, is the most preferred because such eukaryotic cells, and in particular mammalian cells, are more likely than prokaryotic cells to assemble and secrete a properly folded and immunologically active antibody. Prokaryotic expression of antibody genes has been reported to be ineffective for production of high yields of active antibody (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Preferred mammalian host cells for expressing the recombinant antibodies of this disclosure include Chinese Hamster Ovary (CHO cells) (including dhfr$^-$ CHO cells, described in Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, used with a DHFR selectable marker, *e.g.*, as described in R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), NSO myeloma cells, COS cells and SP2 cells. Another preferred expression system is the GS gene expression system disclosed in WO 87/04462 (to Wilson), WO 89/01036 (to Bebbington) and EP 338,841 (to Bebbington). When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into

mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or, more preferably, secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the culture medium using standard protein purification methods.

In a preferred embodiment, the invention provides an expression vector encoding an anti-NGF antibody, wherein the vector comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11 encoding an antibody heavy chain and the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 14 encoding an antibody light chain. A preferred expression vector of the invention comprises the GS (glutamine synthetase) gene. In another preferred embodiment, the invention provides a host cell comprising an expression vector of the invention. A preferred host cell of the invention is a CHO (Chinese Hamster Ovary) cell. In yet another preferred embodiment, the invention provides a method of expressing an anti-NGF antibody comprising culturing a host cell comprising an expression vector comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11 (encoding an antibody heavy chain) and the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 14 (encoding an antibody light chain) such that an anti-NGF antibody comprising a heavy chain encoded by SEQ ID NO: 11 and a light chain encoded by SEQ ID NO: 14 is expressed.

In yet another aspect, the invention pertains to a process for making an anti-NGF antibody which has a mutation in a constant region of the antibody (e.g., a hinge region mutation), the process comprising introducing the appropriate mutation into the constant region, for example by standard recombinant DNA techniques. For example, the invention provides a process for making an anti-NGF antibody, wherein the antibody comprises (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10 (and, for example, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days, or additionally or alternatively, has a mean pharmacologic half life in humans of at least 30 days, or at least 35 days, or at least 40 days, or in a range of at least four to six weeks, or in a range of four to six weeks, or in a range of at least four to seven weeks, or in a range of four to seven weeks, or in a range of at least four to eight weeks or in a range of four to eight weeks), wherein the process for making the antibody comprises mutating the serine at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 to proline to create the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10. Preferably, the heavy chain variable region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1. Preferably, the light chain variable region comprises the amino acid

sequence of SEQ ID NO: 2. Preferably, the heavy chain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13. Preferably, the light chain comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16.

IV. Pharmaceutical Compositions

In another aspect, the present invention provides a composition, *e.g.*, a pharmaceutical composition, containing an antibody of the invention formulated together with a pharmaceutically acceptable carrier. In preferred embodiments, the pharmaceutical composition is suitable for administration intravenously, subcutaneously (*e.g.*, via an injection pen) or intra-articularly, although other suitable routes of administration are described herein. In one embodiment, the composition can include a combination of multiple (*e.g.*, two or more) antibodies of the invention, for example, antibodies that bind different epitopes on NGF.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, salts, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Depending on the route of administration, the active compound may be coated in a material to protect the compound from the action of acids and other natural conditions that may inactivate the compound.

A "pharmaceutically acceptable salt" refers to a salt that retains the desired biological activity of the parent compound and does not impart any undesired toxicological effects (see *e.g.*, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Examples of such salts include acid addition salts and base addition salts. Acid addition salts include those derived from nontoxic inorganic acids, such as hydrochloric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydroiodic, phosphorous and the like, as well as from nontoxic organic acids such as aliphatic mono- and dicarboxylic acids, phenyl-substituted alkanoic acids, hydroxy alkanoic acids, aromatic acids, aliphatic and aromatic sulfonic acids and the like. Base addition salts include those derived from alkaline earth metals, such as sodium, potassium, magnesium, calcium and the like, as well as from nontoxic organic amines, such as N,N'-dibenzylethylenediamine, N-methylglucamine, chloroprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, procaine and the like.

Pharmaceutical compositions of the invention can be administered alone or in combination therapy, *i.e.*, combined with other agents. For example, the combination therapy can include a composition of the present invention with at least one or more additional pharmaceutical agents. For example, at least one or more additional pharmaceutical agents may be administered separately or can also be incorporated into

the compositions. In a preferred embodiment, an anti-NGF antibody of the invention is administered in combination with a second pharmaceutical agent, wherein the second pharmaceutical agent is selected from the group consisting of NSAIDs, analgesics (including opioid analgesics and atypical analgesics), local anaesthetics, nerve blocks, phenol blocks, therapeutic antibodies, steroids, anti-convulsants, anti-depressants, topical capsaicin and antiviral agents. A particularly preferred class of second pharmaceutical agents for use in pain alleviation are the opioid analgesics. Additionally or alternatively, a second treatment regimen can be combined with use of an antibody of the invention, for example in the alleviation of pain. Examples of such second treatment regimens include radiotherapy (*e.g.*, for cancer pain), surgical procedures (*e.g.*, gasserian ganglion and retrogasserian ablative (needle) procedures for trigeminal neuralgia), hypnosis and acupuncture.

Examples of NSAIDS include acetylated salicylates including aspirin; nonacetylated salicylates including salsalate, diflunisal; acetic acids including etodolac, diclofenac, indomethacin, ketorolac, nabumetone; propionic acids including fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, naproxen sodium, oxaprozin; fenamates including meclofenamate, mefenamic acid; phenylbutazone, piroxicam; COX-2 inhibitors including celecoxib, etoricoxib, valdecoxib, rofecoxib, lumiracoxib. Examples of analgesics include paracetamol (acetaminophen), tramadol, tapentadol, capsaicin (topical), opioid analgesics and atypical analgesics. Examples of opioid analgesics include morphine, codeine, thebaine, hydromorphone, hydrocodone, oxycodone, oxymorphone, desomorphine, diacetylmorphine, nicomorphine, dipropanoylmorphine, benzylmorphine, ethylmorphine, fentanyl, pethidine, methadone, tramadol and propoxyphene. Examples of atypical analgesics include trycyclic anti-depressants, carbazepine, gabapentin, pregabalin, duloxetine and caffeine. Examples of steroids include intraarticular corticosteroids (IACs) and prednisone. Examples of therapeutic antibodies include anti-TNF antibodies, such as Remicade® and Humira®, and antiCD20 antibodies, such as Rituxan® and Arzerra™. Examples of antiviral agents include acyclovir and oseltamivir phosphate (Tamiflu®).

In a preferred embodiment, the combination therapy can include an anti-NGF antibody of the present invention with at least one or more TrkA inhibitors (*e.g.*, compounds that antagonize TrkA activity). TrkA inhibitors can function, for example, by interacting extracellularly with the TrkA receptor, or by interacting intracellularly with the TrkA signaling transduction machinery (*e.g.*, inhibition of TrkA kinase activity). Non-limiting examples of extracellular TrkA inhibitors include anti-TrkA antibodies (such as the humanized anti-TrkA antibodies described in US Patent Publication No. 20090208490 and US Patent Publication No. 20090300780) and NGF peptide mimetics that antagonize TrkA (such as described in Debeir, T. *et al.* (1999)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4067-4072). Non-limiting examples of intracellular TrkA inhibitors include cell-penetrating peptides that antagonize TrkA function (*e.g.*, as described in Hirose, M. *et al.* (2008) *J. Pharmacol. Sci.* 106:107-113; Ueda, K. *et al.* (2010) *J. Pharmacol. Sci.*, March 30, 2010 issue) and small molecule inhibitors such as TrkA kinase inhibitors (*e.g.*, as described in Wood, E.R. *et al.* (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14:953-957; Tripathy, R. *et al.* (2008) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18:3551-3555). Other non-limiting examples of TrkA inhibitors include ARRY-470 and ARRY-872 (Array Biopharma).

In another preferred embodiment, the combination therapy can include an anti-NGF antibody of the present invention with at least one or more Protein Kinase C (PKC) inhibitors (*e.g.*, compounds that antagonize PKC activity).

A composition of the present invention can be administered by a variety of methods known in the art. As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results. Preferably, the carrier is suitable for intravenous, intra-articular, subcutaneous, intramuscular, parenteral, intra-tumoral, intranasal, intravesicular, intrasynovial, oral, mucosal, sublingual, spinal or epidermal administration or by instillation into body cavities (*e.g*, abdomen, pleural cavity, nasal sinuses) or onto the surface of the eye, or into the lungs by administration by inhalation. For particular routes of administration, a suitable delivery device may be chosen for use. For example, for subcutaneous or intramuscular administration, an injection pen (*e.g.*, that can be self-administered) can be used. Such injection pens, also referred to as injectors, are known in the art, including those that contain a liquid dose of antibody (such as the single-use injection pen used to administer Humira®) and, more preferably, those that contain a solid dose of antibody that is reconstituted into a liquid form immediately prior to injection. Also for subcutaneous administration, a subcutaneous implant can be used. Additionally, transcutaneous delivery can be achieved by use of a topical cutaneous (skin) patch (*e.g.*, adhesive patch). Transcutaneous delivery also can be achieved by injection of dry powder (such as injectors commercially available from Glide Pharma). Still further, for delivery into the lungs (*e.g.*, in the treatment of asthma or intractable cough), a nebulized solution in a nebulizing device can be used.

The active compounds can be prepared with carriers that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations are patented or generally known to those skilled in the

art. *See, e.g., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

To administer a compound of the invention by certain routes of administration, it may be necessary to coat the compound with, or co-administer the compound with, a material to prevent its inactivation. For example, the compound may be administered to a subject in an appropriate carrier, for example, liposomes, or a diluent. Pharmaceutically acceptable diluents include saline and aqueous buffer solutions. Liposomes include water-in-oil-in-water CGF emulsions as well as conventional liposomes (Strejan *et al.* (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).

Pharmaceutically acceptable carriers include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the pharmaceutical compositions of the invention is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

Therapeutic compositions typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. The composition can be formulated as a solution, microemulsion, liposome, or other ordered structure suitable to high drug concentration. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent that delays absorption, for example, monostearate salts and gelatin.

Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by sterilization microfiltration. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and freeze-drying (lyophilization) that yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Dosage regimens are adjusted to provide the optimum desired response (*e.g.*, a therapeutic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. A typical single dose (which may be administered on a dosing schedule as described further below) might range from about any of 0.1 μg/kg to 1 μg/kg to 3 μg/kg to 30 μg/kg to 300 μg/kg to 3000 μg/kg (3 mg/kg), to 30 mg/kg to 100 mg/kg or more, depending on the factors described herein. For example, an anti-NGF antibody may be administered at about 1 μg/kg, about 10 μg/kg, about 20 μg/kg, about 50 μg/kg, about 100 μg/kg, about 200 μg/kg, about 300 μg/kg, about 400 μg/kg about 500 μg/kg, about 1 mg/kg, about 2 mg/kg or about 3 mg/kg. In a preferred embodiment, the anti-NGF antibody is administered at a dose in a range from about 3 μg/kg to about 3000 μg/kg. In another preferred embodiment, the anti-NGF antibody is administered at a dose of 100 μg/kg. In another preferred embodiment, the anti-NGF antibody is administered at a dose of 200 μg/kg. In another preferred embodiment, the anti-NGF antibody is administered at a dose of 300 μg/kg. In another preferred embodiment, the anti-NGF antibody is administered at a dose of 400 μg/kg.

For repeated administrations over several days, weeks or months or longer, depending on the condition, the treatment is sustained until a desired suppression of symptoms occurs or until sufficient therapeutic levels are achieved (*e.g.*, to reduce pain). An exemplary dosing regimen comprises administering an initial dose in a range of about 3 μg/kg to 500 μg/kg, followed by a monthly maintenance dose of about 3 μg/kg to 500 μg/kg of the anti-NGF antibody. In another embodiment, a dose of about 200 μg/kg is administered once every month. In yet another embodiment, a dose of about 400 μg/kg is administered once every two months. However, other dosage regimens may be useful, depending on the pattern of pharmacokinetic decay that the practitioner wishes to achieve. For example, in some embodiments, dosing from one to four times a week is contemplated. However, given the long duration of pain alleviation by the anti-NGF antibodies, less frequent dosing may be used. In some embodiments, the anti-NGF antibody is administered once every week, once every 2 weeks, once every 3 weeks, once every 4 weeks, once every 5 weeks, once every 6 weeks, once every 7 weeks, once every 8 weeks, once every 9 weeks, once every 10 weeks, once every 15 weeks, once every 20 weeks, once every 25 weeks, once every 26 weeks, or longer. In some embodiments, the anti-NGF antibody is administered once every 1 month, once every 2 months, once every 3 months, once every 4 months, once every 5 months, once every 6 months, or longer.

As discussed further in Example 6, in a preferred embodiment, an anti-NGF antibody of the invention is administered (*e.g.*, to a human) intravenously at a dose in a

range of 0.1 mg/kg to 0.2 mg/kg, preferably 0.15 mg/kg, once every 12 weeks. In another preferred embodiment, an anti-NGF antibody of the invention is administered (*e.g.*, to a human) subcutaneously at a dose in a range of 0.2 mg/kg to 0.4 mg/kg, preferably 0.3 mg/kg, once every twelve weeks. In yet other embodiments, an anti-NGF antibody of the invention is administered at a dose in a range of 0.1 mg/kg to 3 mg/kg, or in a range of 0.1 mg/kg to 30 mg/kg, or in a range of 0.1 mg/kg to 20 mg/kg, or in a range of 0.1 mg/kg to 10 mg/kg, or in a range of 1 mg/kg to 30 mg/kg, or in a range of 1 mg/kg to 20 mg/kg or in a range of 1 mg/kg to 10 mg/kg.

It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be treated; each unit contains a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of sensitivity in individuals. For example, non-limiting examples of dosage unit forms include 0.2 mg (corresponding to a dose of 3 μg/kg in a person of about 70 kg), 2 mg (corresponding to a dose of 30 μg/kg in a person of about 70 kg) and 7 mg (corresponding to a dose of 100 μg/kg in a person of about 70 kg).

Examples of pharmaceutically-acceptable antioxidants include: (1) water soluble antioxidants, such as ascorbic acid, cysteine hydrochloride, sodium bisulfate, sodium metabisulfite, sodium sulfite and the like; (2) oil-soluble antioxidants, such as ascorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), lecithin, propyl gallate, alpha-tocopherol, and the like; and (3) metal chelating agents, such as citric acid, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sorbitol, tartaric acid, phosphoric acid, and the like.

Formulations may conveniently be presented in dosage unit form and may be prepared by any methods known in the art of pharmacy. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will vary depending upon the subject being treated, and the particular mode of administration.. The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will generally be that amount of the composition which produces a therapeutic effect. Generally, out of one

hundred per cent, this amount will range from about 0.001 per cent to about ninety percent of active ingredient, preferably from about 0.005 per cent to about 70 per cent, most preferably from about 0.01 per cent to about 30 per cent.

The phrases "parenteral administration" and "administered parenterally" as used herein means modes of administration other than enteral and topical administration, usually by injection, and includes, without limitation, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, intradermal, intraperitoneal, transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal, epidural and intrasternal injection and infusion.

Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers which may be employed in the pharmaceutical compositions of the invention include water, ethanol, polyols (such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof, vegetable oils, such as olive oil, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Proper fluidity can be maintained, for example, by the use of coating materials, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions, and by the use of surfactants.

These compositions may also contain adjuvants such as preservatives, wetting agents, emulsifying agents and dispersing agents. Particular examples of adjuvants which are well-known in the art include, for example, inorganic adjuvants (such as aluminum salts, e.g., aluminum phosphate and aluminumhydroxide), organic adjuvants (*e.g.*, squalene), oil-based adjuvants, virosomes (*e.g.*, virosomes which contain a membrane-bound hemagglutinin and neuraminidase derived from the influenza virus).

Prevention of presence of microorganisms may be ensured both by sterilization procedures, *supra*, and by the inclusion of various antibacterial and antifungal agents, for example, paraben, chlorobutanol, phenol sorbic acid, and the like. It may also be desirable to include isotonic agents, such as sugars, sodium chloride, and the like into the compositions. In addition, prolonged absorption of the injectable pharmaceutical form may be brought about by the inclusion of agents which delay absorption such as aluminum monostearate and gelatin.

When the compounds of the present invention are administered as pharmaceuticals, to humans and animals, they can be given alone or as a pharmaceutical composition containing, for example, 0.001 to 90% (more preferably, 0.005 to 70%, such as 0.01 to 30%) of active ingredient in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.

Regardless of the route of administration selected, the compounds of the present invention, which may be used in a suitable hydrated form, and/or the pharmaceutical compositions of the present invention, are formulated into pharmaceutically acceptable dosage forms by conventional methods known to those of skill in the art.

Actual dosage levels of the active ingredients in the pharmaceutical compositions of the present invention may be varied so as to obtain an amount of the active ingredient which is effective to achieve the desired therapeutic response for a particular patient, composition, and mode of administration, without being toxic to the patient. The selected dosage level will depend upon a variety of pharmacokinetic factors including the activity of the particular compositions of the present invention employed, or the ester, salt or amide thereof, the route of administration, the time of administration, the rate of excretion of the particular compound being employed, the duration of the treatment, other drugs, compounds and/or materials used in combination with the particular compositions employed, the age, sex, weight, condition, general health and prior medical history of the patient being treated, and like factors well known in the medical arts. A physician or veterinarian having ordinary skill in the art can readily determine and prescribe the effective amount of the pharmaceutical composition required. For example, the physician or veterinarian could start doses of the compounds of the invention employed in the pharmaceutical composition at levels lower than that required in order to achieve the desired therapeutic effect and gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. In general, a suitable daily dose of a composition of the invention will be that amount of the compound which is the lowest dose effective to produce a therapeutic effect. Such an effective dose will generally depend upon the factors described above.

Therapeutic compositions can be administered with medical devices known in the art. For example, in a preferred embodiment, a therapeutic composition of the invention can be administered with a needleless hypodermic injection device, such as the devices disclosed in U.S. Patent Nos. 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824, or 4,596,556. Examples of well-known implants and modules useful in the present invention include: U.S. Patent No. 4,487,603, which discloses an implantable micro-infusion pump for dispensing medication at a controlled rate; U.S. Patent No. 4.,486,194, which discloses a therapeutic device for administering medications through the skin; U.S. Patent No. 4,447,233, which discloses a medication infusion pump for delivering medication at a precise infusion rate; U.S. Patent No. 4,447,224, which discloses a variable flow implantable infusion apparatus for continuous drug delivery; U.S. Patent No. 4,439,196, which discloses an osmotic drug delivery system having multi-chamber compartments; and U.S. Patent No. 4,475,196, which discloses an osmotic drug delivery system. Many other such implants, delivery systems, and modules are known to those skilled in the art.

In certain embodiments, the monoclonal antibodies of the invention can be formulated to ensure proper distribution *in vivo*. For example, the blood-brain barrier (BBB) excludes many highly hydrophilic compounds. To ensure that the therapeutic

compounds of the invention cross the BBB (if desired), they can be formulated, for example, in liposomes. For methods of manufacturing liposomes, see, *e.g.*, U.S. Patents 4,522,811; 5,374,548; and 5,399,331. The liposomes may comprise one or more moieties which are selectively transported into specific cells or organs, thus enhance targeted drug delivery (*see, e.g.*, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Exemplary targeting moieties include folate or biotin (see, *e.g.*, U.S. Patent 5,416,016 to Low *et al.*); mannosides (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); antibodies (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); surfactant protein A receptor (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), different species of which may comprise the formulations of the inventions, as well as components of the invented molecules; p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); see also K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

V. Methods of Using Antibodies of the Invention

In another aspect, the invention provides a method of treating, *e.g.*, attenuating or inhibiting, an NGF-related disease or condition in a subject, the method comprising administering to the subject the anti-NGF antibody of the invention. Preferably, the anti-NGF antibody is used to attenuate or alleviate pain, *e.g.*, pain associated with a disease or condition wherein the development or maintenance of the pain is mediated, at least in part, by NGF. Non-limiting examples of NGF-related disease or condition include inflammatory pain, post-surgical pain, post-operative pain (including dental pain), neuropathic pain, peripheral neuropathy, diabetic neuropathy, fracture pain, gout joint pain, post-herpetic neuralgia, cancer pain, osteoarthritis or rheumatoid arthritis pain, sciatica, pains associated with sickle cell crises, headaches (*e.g.*, migraines, tension headache, cluster headache), dysmenorrhea, endometriosis, uterine fibroids, musculoskeletal pain, chronic low back pain, fibromyalgia, sprains, visceral pain, ovarian cysts, prostatitis, chronic pelvic pain syndrome, cystitis, interstitial cystitis, painful bladder syndrome and/or bladder pain syndrome, pain associated with chronic abacterial prostatitis, incisional pain, migraine, trigeminal neuralgia, pain from burns and/or wounds, pain associated with trauma, pain associated with musculoskeletal diseases, ankylosing spondilitis, periarticular pathologies, pain from bone metastases, pain from HIV, erythromelalgia or pain caused by pancreatitis or kidney stones, malignant melanoma, Sjogren's syndrome, asthma, (*e.g.*, uncontrolled asthma with severe airway hyper-responsiveness), intractable cough, demyelinating diseases, chronic alcoholism, stroke, thalamic pain syndrome, pain from toxins, pain from chemotherapy, fibromyalgia, inflammatory bowel disorders, irritable bowel syndrome, inflammatory

eye disorders, inflammatory or unstable bladder disorders, psoriasis, skin complaints with inflammatory components, sunburn, carditis, dermatitis, myositis, neuritis, collagen vascular diseases, chronic inflammatory conditions, inflammatory pain and associated hyperalgesia and allodynia, neuropathic pain and associated hyperalgesia or allodynia, diabetic neuropathy pain, causalgia, sympathetically maintained pain, deafferentation syndromes, epithelial tissue damage or dysfunction, disturbances of visceral motility at respiratory, genitourinary, gastrointestinal or vascular regions, allergic skin reactions, pruritis, vitiligo, general gastrointestinal disorders, colitis, gastric ulceration, duodenal ulcers, vasomotor or allergic rhinitis, bronchial disorders, dyspepsia, gastroesophageal reflux, pancreatitis, and visceralgia.

Furthermore, NGF has been implicated in the proliferation of cancers such as prostate cancer, thyroid cancer, lung cancer, prolactinoma and melanoma. Accordingly, in another embodiment, the NGF-related disease or condition that can be treated using an anti-NGF antibody of the invention is cancer, preferably prostate cancer, thyroid cancer, lung cancer, prolactinoma or melanoma. Thus, in another embodiment, the invention also provides a method of treating cancer in a subject, preferably prostate cancer, thyroid cancer, lung cancer, prolactinoma or melanoma, comprising administering an anti-NGF antibody of the invention to the subject.

Still further, in another embodiment, the NGF-related disease or condition can be HIV/AIDS. Blockage of NGF using an anti-NGF antibody of the invention may block HIV infected macrophages, thereby treating HIV/AIDS. Accordingly, in another embodiment, the invention also provides a method of treating HIV/AIDS in a subject, comprising administering an anti-NGF antibody of the invention to the subject.

Particularly preferred diseases and conditions for treatment according to the methods of the invention include inflammatory pain (particularly osteoarthritis or rheumatoid arthritis pain), musculoskeletal pain (particularly chronic low back pain), cancer pain, neuropathic pain (particularly diabetic neuropathic pain), pain from bone metastases, interstitial cystitis/ painful bladder syndrome, pain associated with chronic abacterial prostatitis, pain from endometriosis and/or uterine fibroids, and post-operative pain.

Pain and/or other symptoms associated with endometriosis and/or uterine fibroids may comprise dysmenorrhoea; chronic non-menstrual, pelvic pain; dyspareunia; dyschexia; menorrhagia; lower abdominal or back pain; infertility and subfertility; dysuria; bloating and pain on micturition; nausea, vomiting and/or diarrohea. Symptoms may also comprise symptoms related to endometriotic lesions or fibroids located outside the peritoneal cavity including for example thoracic endometriosis syndrome manifest as haemoptysis, pneumothorax or haemothorax, and pulmonary leiomyosis manifest as dyspnoea and a pulmonary mass.

In a particularly preferred embodiment, an anti-NGF antibody of the invention is used to treat pain. Preferably, the type of pain treated is selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain and endometriosis and/or uterine fibroid pain. Accordingly, in a preferred embodiment, the invention provides a method of treating pain in a subject comprising administering an anti-NGF antibody of the invention such that pain in the subject is treated. Preferably, the pain is selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain and endometriosis and/or uterine fibroid pain. Accordingly, in one embodiment, the invention provides a method of treating osteoarthritis pain in a subject comprising administering an anti-NGF antibody of the invention such that osteoarthritis pain in the subject is treated. In another embodiment, the invention provides a method of treating chronic low back pain in a subject comprising administering an anti-NGF antibody of the invention such that chronic low back pain in the subject is treated. In yet another embodiment, the invention provides a method of treating diabetic neuropathic pain in a subject comprising administering an anti-NGF antibody of the invention such that diabetic neuropathic pain in the subject is treated. In yet another embodiment, the invention provides a method of treating cancer pain in a subject comprising administering an anti-NGF antibody of the invention such that cancer pain in the subject is treated. In yet another embodiment, the invention provides a method of treating endometriosis and/or uterine fibroid pain in a subject comprising administering an anti-NGF antibody of the invention such that endometriosis and/or uterine fibroid pain in the subject is treated.

In another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody as described herein for treating an NGF-related disease. Non-limiting examples of NGF-related diseases or conditions include those listed above. In another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody as described herein for treating pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody as described herein for treating pain selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain and endometriosis and/or uterine fibroid pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody as described herein for treating osteoarthritis pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody as described herein for treating chronic low back pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody as described herein for treating diabetic neuropathic pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody as described herein for treating cancer pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody as described herein for treating endometriosis and/or uterine fibroid pain.

In a particular embodiment, the invention provides a method of attenuating or inhibiting pain in a subject, the method comprising administering to the subject an anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, and wherein the antibody alleviates pain in the subject for a duration of at least about four weeks to about twelve weeks (or at least four to twelve weeks, or at least four weeks, or at least eight weeks, or at least twelve weeks, or for one to twelve weeks, or for four to twelve weeks or for eight to twelve weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. Preferably, the pain is selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain, endometriosis pain and uterine fibroid pain. Preferably the anti-NGF antibody is administered at a dose in a range from about 0.1 mg/kg to 3 mg/kg, or from 0.1 mg/kg to 3 mg/kg, or from about 0.1 mg/kg to about 30 mg/kg, or from 0.1 mg/kg to 30 mg/kg or at one of the other dosage ranges described herein.

In another particular embodiment, the invention provides a method of attenuating or inhibiting a nerve growth factor (NGF)-related disease or condition in a subject such that a rebound effect is avoided in the subject, the method comprising administering to the subject an anti-NGF antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a hinge region mutation at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9, and wherein the antibody has a terminal elimination half-life in a human of at least 10-30 days (or at least 10 days, or at least 15 days, or at least 20 days, or at least 25 days, or at least 30 days, or at least 40 days, or in a range of about 10 days to about 40 days, or in a range of 10-40 days, or in a range of about 15 to about 30 days, or in a range of 15-30 days), wherein the antibody is administered to the subject at a dosage and at a frequency such that a rebound effect is avoided in the subject. Preferably, the serine at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 is mutated to proline. Preferably, the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10. Preferably, the antibody competes for binding to NGF with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Preferably, the NGF-related disease or condition is pain selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain, endometriosis pain and uterine fibroid pain. Preferably, the anti-NGF antibody is administered at a dose in a range from about 0.001 mg/kg to about 30 mg/kg, more preferably from 0.1 mg/kg to 3 mg/kg, or at one of the other dosage ranges described herein. More preferably, to avoid a rebound effect, the antibody is administered at a lower dosage range, for example in a range of 0.001 mg/kg to 1 mg/kg, or in a range of 0.001 mg/kg to 1 mg/kg or in a range of 0.001 mg/kg to 0.5 mg/kg or in

a range of 0.001 mg/kg to 0.3 mg/kg, or in a range of 0.01 mg/kg to 1 mg/kg or in a range of 0.01 mg/kg to 0.5 mg/kg or 0.01 mg/kg to 0.3 mg/kg. More preferably, to avoid a rebound effect, the antibody is administered at a lower dosage range (as set forth above) and at more frequent intervals, such as once every week, or once every two weeks, or once every four weeks.

The invention also provides for use of the anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for use to attenuate or inhibit an NGF-related disease or condition in a subject. Non-limiting examples of NGF-related diseases or conditions include those listed above. In another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for treating pain selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain and endometriosis and/or uterine fibroid pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of osteoarthritis pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of chronic low back pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of diabetic neuropathic pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer pain. In yet another embodiment, the invention provides an anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of endometriosis and/or uterine fibroid pain. In a preferred embodiment, the anti-NGF antibody is administered at a dose in a range from about 3 μg/kg to about 3000 μg/kg, or at a dose of 100 μg/kg, or at a dose of 300 μg/kg. In another preferred embodiment, an anti-NGF antibody of the invention is administered (*e.g.*, to a human) intravenously at a dose in a range of 0.1 mg/kg to 0.2 mg/kg, preferably 0.15 mg/kg, once every 12 weeks. In another preferred embodiment, an anti-NGF antibody of the invention is administered (*e.g.*, to a human) subcutaneously at a dose in a range of 0.2 mg/kg to 0.4 mg/kg, preferably 0.3 mg/kg, once every twelve weeks. In yet other embodiments, an anti-NGF antibody of the invention is administered at a dose in a range of 0.1 mg/kg to 3 mg/kg, or in a range of 0.1 mg/kg to 30 mg/kg, or in a range of 0.1 mg/kg to 20 mg/kg, or in a range of 0.1 mg/kg to 10 mg/kg, or in a range of 1 mg/kg to 30 mg/kg, or in a range of 1 mg/kg to 20 mg/kg or in a range of 1 mg/kg to 10 mg/kg. However, other suitable dosage ranges and doses are set forth above in the section on pharmaceutical compositions.

In a preferred embodiment, the anti-NGF antibody is administered intravenously. In another preferred embodiment, the anti-NGF antibody is administered subcutaneously or intra-articularly. However, other suitable routes of administration are set forth above in the section on pharmaceutical compositions.

In a preferred embodiment, an anti-NGF antibody of the invention alleviates pain in a subject to which the antibody is administered for a long duration. For example, in one embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about one week to about twelve weeks (or for at least one week to twelve weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In another embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about one week (or at least one week) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In another embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about two weeks (or at least two weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In another embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about four weeks (or at least four weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In another embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about eight weeks (or at least eight weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In another embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about twelve weeks (or at least twelve weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In one embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about four weeks to about twelve weeks (or for four weeks to twelve weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject. In one embodiment, the antibody alleviates pain for a duration of at least about eight weeks to about twelve weeks (or for eight weeks to twelve weeks) after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject.

In another embodiment, the anti-NGF antibody is administered together with a second pharmaceutical agent or a second treatment regimen. The antibody and the second agent, or the antibody and the second treatment regimen, can be administered or performed simultaneously or, alternatively, the antibody can be administered first, followed by the second pharmaceutical agent or second regimen, or the second pharmaceutical agent or regimen can be administered or performed first, followed by the antibody. Non-limiting examples of suitable second pharmaceutical agents and second treatment regimens are set forth above in the section on pharmaceutical compositions. Particularly referred second pharmaceutical agents for use in combination with an antibody of the invention are opioid analgesics. Other preferred second pharmaceutical agents for use in combination with an antibody of the invention are TrkA inhibitors (*e.g.*,

extracelluar TrkA inhibitors or intracellular TrkA inhibitors, as described in detail in the section on pharmaceutical compositions) and Protein Kinase C (PKC) inhibitors.

In yet another aspect, the invention provides a method of attenuating or inhibiting a nerve growth factor (NGF)-related disease or condition in a subject such that a rebound effect is avoided in the subject, the method comprising administering to the subject an anti-NGF antibody of the invention, such as an anti-NGF antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a mutation (preferably a hinge region mutation) and wherein the antibody has a terminal elimination half-life in a cynomolgus monkey of at least 15 days. In another embodiment, the antibody has a terminal elimination half-life in a cynomolgus monkey in a range of about 15 days to about 22 days (or in a range of 15-22 days), or in a range of about 15 days to about 28 days (or in a range of 15-28 days), or in a range of about 21 days to about 28 days (or in a range of 21-28 days). In another embodiment, the antibody has a terminal elimination half-life in a rat of at least 8 days. In yet another embodiment, the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days (or at least 10 days, at least 15 days, at least 20 days, at least 25 days, at least 30 days, at least 40 days, or in a range of about 10 days to about 40 days or in a range of 10-40 days or in a range of about 15 to about 30 days or in a range of 15-30 days). Preferred mutations include those described in detail hereinbefore. Preferred antibodies include anti-NGF antibodies of the sequences and/or having the functional properties described in detail hereinbefore. Non-limiting examples of NGF-related diseases or conditions include those described in detail hereinbefore. The invention also provides for use of an anti-NGF antibody of the invention for the manufacture of a medicament for use to attenuate or inhibit an NGF-related disease or condition in a subject such that a rebound effect is avoided in the subject (*e.g.*, the antibody is administered at a dosage and at a frequency such that a rebound effect is avoided in the subject).

VI. Articles of Manufacture

Also within the scope of the present invention are kits comprising antibodies of the invention which optionally include instructions for use in treating an NGF-related disease or condition. The kits may include a label indicating the intended use of the contents of the kit. The term label includes any writing, marketing materials or recorded material supplied on or with the kit, or which otherwise accompanies the kit.

For example, the invention also provides a packaged pharmaceutical composition wherein the PG110 antibody (having a heavy chain as shown in SEQ ID NO: 13 and having a light chain as shown in SEQ ID NO: 16), or derivatized forms, as described herein, is packaged within a kit or an article of manufacture. The kit or article of

manufacture of the invention contains materials useful for the treatment, including prevention, treatment and/or diagnosis of an NGF related disease or condition in a subject. In preferred embodiments, the NGF related disease or condition is inflammatory pain (particularly osteoarthritis or rheumatoid arthritis pain), musculoskeletal pain (particularly chronic low back pain), neuropathic pain (particularly diabetic neuropathic pain), cancer pain (particularly pain from bone metastases), pain associated with endometriosis and/or uterine fibroids, and post-operative pain. The kit or article of manufacture comprises a container and a label or package insert or printed material on or associated with the container which provides information regarding use of the PG110 antibody, for the treatment of an NGF related disease or condition described herein.

A kit or an article of manufacture refers to a packaged product comprising components with which to administer a PG110 antibody for treatment of an NGF related disease or condition. The kit preferably comprises a box or container that holds the components of the kit, and can also include a protocol for administering the PG110 antibody and/or a "package insert". The box or container holds components of the invention which are preferably contained within plastic, polyethylene, polypropylene, ethylene, or propylene vessels. For example, suitable containers for the PG110 antibody, include, for example, bottles, vials, syringes, pens, etc.

The term "package insert" is used to refer to instructions customarily included in commercial packages of therapeutic products, that contain information about the indications, usage, dosage, administration, contraindications and/or warnings concerning the use of such therapeutic products. In one embodiment, the package insert of the invention informs a reader, including a subject, *e.g.*, a purchaser, who will be administering the PG110 for treatment, that the PG110 antibody is indicated for treatment of an NGF related disease or condition as described herein. In one embodiment, the package insert describes certain therapeutic benefits of the PG110 antibody, including alleviation of pain. In another embodiment, the package insert can include a description of the dosage of the PG110 antibody. In another embodiment, the package insert can include a description of the route and frequency of administration of the PG110 antibody. In another embodiment, the package insert of the invention may also provide information to subjects who will be receiving PG110 antibody regarding combination uses for both safety and efficacy purposes. For example, in certain embodiments the kit further comprises a second pharmaceutical composition comprising an additional therapeutic packaged with or copromoted with instructions for administration of both agents for the treatment of an NGF-related disease or condition. Particularly preferred diseases and conditions for treatment using the kits of the invention include inflammatory pain (particularly osteoarthritis or rheumatoid arthritis

pain), musculoskeletal pain (particularly chronic low back pain), neuropathic pain (particularly diabetic neuropathy), cancer pain and pain from bone metastases, pain associated with endometriosis and/or uterine fibroids, and post-operative pain.

Other embodiments of the present invention are described in the following Examples.

The present invention is further illustrated by the following examples which should not be construed as further limiting. The contents of Sequence Listings, figures and all references, patents and published patent applications cited throughout this application are expressly incorporated herein by reference.

Examples

Example 1: Construction of an Anti-NGF Antibody, PG110, with a Mutated IgG4 Hinge Region

In this example, a mutated form of a humanized anti-NGF antibody was created by introducing a Serine to Proline mutation in the hinge region of the IgG4 constant region.

The heavy chain variable region and light chain variable region of the humanized anti-NGF antibody alphaD11 were used. The humanized alphaD11 antibody is described in further detail in PCT Publications WO 2005/061540 and WO 2006/131951. The amino acid sequence of the heavy chain variable region of alphaD11 (Hu-alphaD11 V_H) is shown in SEQ ID NO: 1. The amino acid sequence of the light chain variable region of alphaD11 (Hu-alphaD11 V_L) is shown in SEQ ID NO: 2. The CDR1, 2 and 3 regions of Hu-alphaD11 V_H are shown in SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively. The CDR1, 2 and 3 regions of Hu-alphaD11 V_L are shown in SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively.

Nucleic acid sequence encoding Hu-alphaD11 V_H was joined at the 3' end to Lonza Biologic's IgG4-Pro constant region (which encodes a mutation that alters amino acid residue 108 of the constant sequence from a serine to a proline). A murine IgG1 derived signal sequence was introduced at the 5' end to produce the complete Hu-alphaD11 heavy chain cDNA sequence. The amino acid sequence of the wild type human IgG4 constant region is shown in SEQ ID NO: 9, whereas the amino acid sequence of the mutated human IgG4 constant region is shown in SEQ ID NO: 10. Within SEQ ID NOs: 9 and 10, the amino acid that is mutated from serine (in SEQ ID NO: 9) to proline (in SEQ ID NO: 10) is located at amino acid position 108.

Nucleic acid sequence encoding Hu-alphaD11 V_L was linked at the 3' end to the human kappa constant region (supplied by Lonza Biologics) and a murine IgG1 derived signal sequence introduced at the 5' to thereby encode a full-length light chain variable region.

Since the antibody was to be expressed in Chinese Hamster Ovary (CHO cells) codon optimization was performed (Geneart; using GeneOptimizer™ software) that involved adaptation of the antibody sequences to the codon bias of *Cricetulus griseus* (Chinese hamster) genes. Additionally, regions of very high (>80%) or very low (<30%) GC-content were avoided where possible. During the optimization process, the following *cis*-acting sequence motifs were avoided: internal TATA-boxes, chi-sites and ribosomal entry sites; AT-rich or GC-rich sequence stretches; ARE, INS, CRS sequence elements (involved in vector replication in bacteria); repeat sequences and RNA secondary structures; (cryptic) splice donor and acceptor sites and branch points; specified internal restriction enzyme sites (*Eco* RI, *Hind* III, *Pvu* I and *Not* I). Antibody gene sequence optimization, including codon optimization, and expression of antibody genes in CHO cells is described in further detail in PCT Application WO 2006/122822, owned by Lonza Biologics PLC.

The optimized heavy and light chain variable region sequences (including the signal sequences) were cloned into the GS vectors pEE6.4 and pEE12.4, respectively (supplied by Lonza Biologics) to generate two single gene vectors (SGVs). Then, a double gene vector (DGV) was constructed by ligating the complete expression cassette from the heavy chain vector into the light chain vector, to create a single vector expressing both complete heavy and light chain genes, as well as the GS (glutamine synthetase) gene.

The resultant mutant antibody was referred to as PG110. The nucleotide sequence of the complete PG110 heavy chain (including signal sequence, variable region and mutated IgG4 constant region) is shown in SEQ ID NO: 11. The amino acid sequence of the complete PG110 heavy chain (including signal sequence, variable region and mutated IgG4 constant region) is shown in SEQ ID NO: 12, wherein amino acid residues 1-19 constitute the signal sequence and amino acids 20-141 constitute the variable region. The amino acid sequence of the mature PG110 heavy chain, without signal sequence (including the variable region and mutated IgG4 constant region) is shown in SEQ ID NO: 13.

The nucleotide sequence of the complete PG110 light chain (including signal sequence, variable region and kappa constant region) is shown in SEQ ID NO: 14. The amino acid sequence of the complete PG110 light chain (including signal sequence, variable region and kappa constant region) is shown in SEQ ID NO: 15, wherein amino acid residues 1-20 constitute the signal sequence and amino acids 21-127 constitute the

variable region. The amino acid sequence of the mature PG110 light chain, without signal sequence (including the variable region and kappa constant region) is shown in SEQ ID NO: 16.

To verify expression of the PG110 antibody, the DGV encoding the heavy and light chains of PG110 was transiently transfected into CHOK1SV cells (supplied by Lonza Biologics). Cells (0.125 x 10^6 viable cells per well) were plated into 24-well plates in a DMEM-based medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 6 mM L-glutamine, and incubated overnight at 37° C (10% CO_2 incubator). Prior to transfection, the seeding medium was replaced with 800 µl fresh medium and cells were incubated for 1 hour at 37° C.

For each transfection, 5 µg of the PG110 DGV was re-suspended in 100 µl transfection medium (OptiMEM, Invitrogen). A vector encoding another IgG_4/kappa antibody was used as a positive control and buffer only was used as a negative control. For each transfection, 5 µl of Lipofectamine-2000 reagent (Invitrogen) was diluted in 100 µl transfection medium. After a 5 minute incubation at room temperature, the DNA and diluted Lipofectamine reagent were combined, mixed and left to stand at ambient temperature for 20 minutes. This 205 µl mixture was then added to a well of the 24-well plate containing cells. Cells were incubated for 68-72 hours at 37° C. The culture supernatant was collected and clarified by centrifugation prior to assay for presence of antibody.

Medium from transfected cells was assayed using a standard ELISA method for assembled IgG. This involved capture of the samples and standards onto a 96-well plate coated with an anti-human IgG Fc. Bound analyte was revealed with an anti-human kappa chain antibody linked to horseradish peroxidase and the chromogenic substrate tetra methylbenzidine. Color development was proportional to the amount of assembled antibody present in the sample. Standard samples were prepared from a commercially obtained stock of IgG_4/kappa antibody. The results showed that the DGV encoding the PG110 heavy and light chains was capable of expressing assembled antibody.

Example 2: Binding Characteristics of Mutated Anti-NGF Antibody PG110

In this example, the binding specificity and binding kinetics of PG110, the mutated anti-NGF antibody prepared as described in Example 1, was examined.

A. Binding Specificity

The selectivity profile of PG110 binding to human neurotrophins was determined using an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) binding assay. ELISA plates

were coated with 100 ng/well of either human NGF (R&D Systems, Cat. No. 256-GF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (R&D Systems, Cat. No. 248-BD), neurotrophin 3 (NT3) (R&D Systems, Cat. No. 267-N3) or neurotrophin 4 (NT4) (R&D Systems, Cat. No. 268-N4). PG110 was added to neurotrophin-coated wells in the concentration range 3 pM – 3 nM. After washing (PBS in 0.5% (v/v) Tween 20, pH 7.3), PG110 binding was detected using a biotinylated anti-human IgG antibody (Rockland Immunochemical Inc., Cat. No. 609-1602) coupled with streptavidin-linked alkaline phosphatase (Sigma Aldrich, Cat. No. S2890), followed by development of a color reaction by addition of 4-methylumbelliferyl phosphate (Sigma Aldrich, Cat. No. M3168). The reaction product was quantified using a fluorimeter (excitation at 360nm; emission at 440 nm).

The results are summarized in the graph of Figure 1. PG110 bound to human NGF-coated wells in a concentration-dependent manner, with a half-maximal binding concentration of 726 pM (derived from triplicate determinations on a single assay plate). In contrast, PG110 did not show measurable binding to assay wells coated with human BDNF, NT3, or NT4, which were otherwise detectable using positive control antibodies specific for these neurotrophins. These results demonstrate that PG110, when tested at concentrations up to 3 nM *in vitro*, specifically binds to human NGF and displays no cross-reactivity to related neurotrophins.

B. Binding Kinetics

BIAcore analysis was used to evaluate the binding kinetics of the interaction between PG110 and either recombinant rat NGF (rrNGF) or recombinant human NGF (rhNGF).

Recombinant human beta nerve growth factor (rhNGF) (R&D Systems, Cat. No. 256 GF/CF) or recombinant rat beta nerve growth factor (rrNGF) (R&D Systems, Cat. No. 556 GF/CF) was immobilized covalently on CM5 sensor chips (GE Healthcare, formerly Biacore AB, Uppsala, Sweden) via primary amine groups using the amine coupling kit (GE Healthcare), with HBSEP (10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 150 mM NaCl, 3 mM ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA) and 0.005 % Tween® 20, pH 7.4) as running buffer. The sensor chip surface was activated by injection of a mixture of 400 mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC) and 100 mM N-Hydroxysuccinimide (NHS) (1:1, v/v) for 7 minutes at a flow rate of 10 µl/min. β-NGF (rh or rr) was diluted to 200 ng/ml in 10 mM sodium acetate pH 4.0 and the diluted solution was injected over the activated surface for various times to yield different surface densities. For quantitative interaction analyses, a surface density of 60 RU was

prepared by injection of 50 µl diluted β-NGF (contact time 5 minutes). Non-reacted NHS esters were deactivated with 70 µl (contact time 7 minutes) ethanolamine solution (1 M, pH 8.5).

The parameters for the experiments performed with immobilized NGF were as follows: running buffer: HBSEP containing 100µg/ml bovine serum albumin; flow rate: 25 µl/min; temperature: 37° C; ligand density: 60RU/60 RU (for rhNGF/rrNGF); analyte: PG110 concentrations: 2nM, 4nM, 8nM, 17nM,33nM, and 66nM in running buffer; contact time: 240 seconds; dissociation time: 600 seconds; regeneration: 2 x 1 min. 10 mM glycine, pH 1.5.

Data and kinetic evaluations were done with GraphPad Prism software (version 5.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA) and BIAevaluation software (version 4.0.1, GE Healthcare), fitting data to the 1:1 Langmuir binding model.

The results are summarized below in Table 1 (wherein K_{ass} indicates association rate constant, K_{diss} indicates dissociation rate constant and K_D indicates equilibrium dissociation constant). The data indicate mean ± (sem) of 3 separate determinations

Table 1: Kinetic Constants of PG110 Interaction with Immobilized NGF

Analyte	Ligand	K_{ass} (l mol^{-1}s^{-1})	K_{diss} (s^{-1})	K_D
PG110	rh NGF	$1.6 \times 10^5 \pm 3.5 \times 10^3$	$1.2 \times 10^{-5} \pm 3.0 \times 10^{-6}$	72 ± 2 pM
PG110	rr NGF	$1.7 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^3$	$1.5 \times 10^{-5} \pm 5.6 \times 10^{-6}$	92 ± 34 pM

The results of the study showed that PG110 interactions with NGF were characterized by high affinity binding and that no significant difference in the affinity (K_D) for either species homologue (human vs. rat) could be detected.

A further analysis of the binding kinetics was performed using PG110 Fab material generated by fragmentation of PG110 on Papain –Sepharose (Thermo Scientific). Immobilization of rhNGF was performed using HBSEP as running buffer at 25°C. Sensor chip surfaces were activated by injection of a mixture of 200 mM EDC and 50 mM NHS (1:1, v/v) for 7 minutes at a flow rate of 10 µl/min. rhNGF was diluted to 500 ng/ml in 10 mM sodium acetate pH 4.0 and 20 µl (contact time 2 minutes) of the diluted solution was injected over the activated surfaces of each of three cells to produce immobilization levels of 93.1, 100.3 and 88.7 RU. Non-reacted NHS esters were deactivated with 70 µl (contact time 7 minutes) ethanolamine (1 M, pH 8.5).

A series of concentrations of PG110 Fab (0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 and 25 nM), in 250 µl, were passed over freshly immobilized rhNGF surfaces at a flow rate of 50µl/min, 37°C in a running buffer of HPSEP containing 100 µg/ml bovine serum albumin. Dissociation was monitored for 30minutes, and after interaction analysis

complete regeneration was achieved with one pulse (30µl) of 10mM glycine pH 1.5. Additionally, to define the very slow k_{diss} more precisely, the dissociation of one high concentration (100 nM) of PG110 Fab was monitored for 8 hours on each rhNGF surface and used for quantification of the dissociation rate constant (k_{diss}). The data were fit globally by a 1:1 Langmuir binding model using a fixed k_{diss}, determined from the extended dissociation measurement. To evaluate reproducibility of the kinetic constants analyses were performed in triplicate on the three freshly immobilized surfaces. The calculated kinetic constants are summarized in Table 2.

Table 2: Kinetic constants of PG110 Fab interaction with immobilized rhNGF.

Analyte	Immobilisation Level	K_{ass} (l $mol^{-1}s^{-1}$)	K_{diss} (s^{-1})	K_D
PG110 Fab	93.1	3.6×10^5	1.1×10^{-5}	31.3 pM
	100.3	3.6×10^5	1.2×10^{-5}	32.7 pM
	88.7	4.4×10^5	1.2×10^{-5}	27.8pM
Mean		$3.8 \times 10^5 \pm 0.5 \times 10^5$	$1.1 \times 10^{-5} \pm 0.06 \times 10^{-5}$	30.6 ± 0.25 pM

Example 3: Functional Characteristics of Mutated Anti-NGF Antibody PG110

In this example, various functional properties of PG110, the mutated anti-NGF antibody prepared as described in Example 1, were examined in *in vitro* assay.

A. Inhibition of NGF Binding to TrkA and $p75^{NTR}$ Receptors

Radioligand binding studies were conducted to compare the inhibitory effect of PG110 on binding of NGF to human TrkA and $p75^{NTR}$ receptors. HEK293 cells expressing either full-length human TrkA or $p75^{NTR}$ receptors were incubated with 2 nM ^{125}I-NGF in the presence of PG110 at a final concentration of 0.01 – 100 nM. Unlabeled NGF (varying in concentration from 0-1 µM) also was included in the reactions. The reactions were performed in high-walled PT1276 flat-bottomed disposable tubes (Thermo Life Sciences). First, the radiolabeled NGF, unlabeled NGF and PG110 antibody were combined and incubated in the tubes for 10 minutes at room temperature, with shaking, in binding buffer (1 x PBS, 0.9 mM CaCl, 0.5 mM MgCl, 0.1% BSA Fraction V, 0.1% (w/v) glucose). Then, 200 µl prepared cells (diluted to 5×10^5

cells/ml) were added. After a further 30 minutes incubation at room temperature with vigorous shaking, each reaction was divided across three plastic tubes (0.4 ml Microtube PE, Sarstedt 72.700), with 100 µl of the reaction being added to each tube. Each microtube already contained 200 µl of 150 mM sucrose in binding buffer. These tubes were then centrifuged at 20,000 x g at 4°C for 30 seconds to pellet the cells. The sucrose provides a density gradient which acts to sequester any displaced radiolabelled NGF. The tubes were then frozen in a dry ice/ethanol bath. The tips of these frozen tubes were then removed into separate plastic tubes (Naiad Ltd) for counting using a LKB Wallac mini-gamma counter to thereby quantify the ^{125}I-NGF bound to the cells.

The results are illustrated in the graphs of Figures 2A and 2B, in which the effect of PG110 on NGF binding to TrkA is shown in Figure 2A and the effect of PG110 on NGF binding to $p75^{NTR}$ is shown in Figure 2B. PG110 inhibited ^{125}I-NGF binding to TrkA and $p75^{NTR}$ receptors in a concentration-dependent manner, with geometric mean (95% CI) IC_{50} values of 170 (88 -331) pM and 206 (86 - 491) pM, respectively (both n=3). An isotype control antibody did not inhibit ^{125}I-NGF binding to either receptor. These results demonstrate that PG110 potently blocks the binding interaction of human NGF with both of its receptors *in vitro*.

B. TF-1 Cell Proliferation Assay

TF-1 is a human erythroleukaemic cell line that expresses human TrkA and proliferates in response to NGF. In these experiments, TF-1 cells were cultured in the presence of 10 ng/mL human, rat, or mouse recombinant NGF, with increasing concentrations of PG110 antibody, and cell proliferation was quantified 40 hours later using a colorimetric method based on the metabolic reduction of the yellow tetrazolium salt MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide] to purple formazan.

Before use in the assay, TF-1 cells were cultured for 1 week in RPMI-1640 containing 10% fetal bovine serum (FBS) with 2 ng/ml GM-CSF (R&D Systems, Cat. No. 215-GM-50). Cells were washed, resuspended in RPMI-1640 + 10% FBS to a concentration of 300,000 cells/ml and replated on 96-well microplates (15,000 cells/well in 50 µl). At least 60 minutes after addition to the 96-well assay plates, cells were exposed to either human, rat or mouse recombinant NGF (10 ng/ml) in RPMI-1640 containing 10% FPB (50 µl/well) containing PG110 antibody. Medium containing NGF and test antibody was prepared at 2X final assay concentration at least 30 minutes before being added to pre-seeded cells. Test antibody was assayed in the concentration range of 0.6 ng/ml to 24 µg/ml. Control wells were included, either containing medium alone or containing TF-1 cells in the absence of NGF ("cellular blank"). Each treatment was

performed in triplicate. After a 40 hour incubation period (37 °C, 5% CO_2), proliferation was quantified using an MTT cell proliferation kit (ATCC Cat. No. 30-1010K). 10 µl MTT reagent was added before incubation for a further 4 hours at 37°C. Wells were then subsequently incubated with Detergent Reagent (100 µl/well; gentle mixing) for overnight incubation at room temperature in the dark. Thereafter, absorbance was recorded at 570 nm. Final average OD values for triplicate measurements were calculated by subtraction of the average value for the cellular blank.

Incubation of TF-1 cells with NGF in the presence of PG110 (0.6 ng/mL- 24 µg/mL) resulted in a concentration-related inhibition of cell proliferation. The results are illustrated in the graphs of Figures 3A-3C, wherein Figure 3A shows the effect of PG110 treatment on TF-1 cell proliferation stimulated by human NGF, Figure 3B shows the effect of PG110 treatment on TF-1 cell proliferation stimulated by rat NGF and Figure 3C shows the effect of PG110 treatment on TF-1 cell proliferation stimulated by mouse NGF. PG110 demonstrated similar inhibitory potencies for all of the homologues of NGF tested and IC_{50} values were approximately 30 ng/mL. The IC_{50} values are summarized below in Table 3 (IC_{50} values are expressed as ng/ml):

Table 3: Summary of IC_{50} Values for PG110 in the TF-1 Cell Proliferation Assay

Human Recombinant NGF			Rat Recombinant NGF			Mouse Recombinant NGF		
Geomean	95% CI	n	Geomean	95% CI	n	Geomean	95% CI	n
29.4	26.5-32.7	5	27.8	24.5-31.6	5	30.8	27.4-34.5	3

The TF-1 cell proliferation assays demonstrate that PG110 equipotently neutralizes the activation of human TrkA receptors by human or rodent NGF.

C. Inhibition of Chick Dorsal Root Ganglion Survival

To test the ability of PG110 to inhibit the effect of NGF on sensory neurons, an *in vitro* assay using primary cultures of dorsal root ganglion (DRG) cells obtained from Day 8 chick embryos was used. Under these conditions, the survival of chick DRGs is dependent on the presence of exogenous NGF added to the culture medium.

Dorsal root ganglion were isolated from day 8 chick embryos and collected in a 50 ml Falcon tube (in 5 ml F-12 Ham's nutrient mixture + Glutamax I: GIBCO 31765-027). In each experiment, the total number of ganglia collected was about 400, which approximately corresponds to 20 embryos. Ganglia were subsequently trypsinized for 5 minutes at 37° C (Trypsin-EDTA Euroclone, ECB3052D) and dissociated with a 10 ml

syringe (20G "yellow" needle) 4-5 times before being centrifuged for 3 minutes at 800 rpm.

After careful removal of trypsin-containing medium, cells were resuspended in 10 ml of fresh medium (F-12 Ham's nutrient mixture + Glutamax I), followed by a repeat of the dissociation procedure, and the medium volume was adjusted for a seeding concentration of 100,000-400,000 cells/ml. Cells were seeded in the absence of treatments in half the final volume containing 20% horse serum (Euroclone ECS0091L), using 24-multi-well plates (Falcon 353047) that had been coated with poly-L-lysine (100x = 1 mg/ml solution of poly-L-lysine hydrobromide; Sigma P2636) dissolved in distilled water (30 minutes under UV, followed by 30 minutes drying under sterile hood).

While cells were adhering to plates (30 minutes in 5% CO_2 incubator, 37° C), solutions of either NGF or NGF/anti-NGF antibody were prepared at 2X concentration in half the final volume and added well by well to reach the correct final concentration (*i.e.*, final % of horse serum = 10%; final concentration of NGF = 5 ng/ml). Control wells were included, containing DRG cells in the absence of NGF. Each condition was tested in duplicate. After the addition of either NGF or NGF/anti-NGF mixtures, the plates were returned to the incubator (5% CO_2, 37° C). The number of cells was scored 48 hours later, by counting all DRG cells observed along the vertical diameter of each well (Nikon TMS microscope, 10X magnification). Only DRG cells were included in the counts, which were easily identifiable according to their morphological characteristics, *i.e.*, round, brilliant, light-refracting cells with long neurites.

The NGF neutralizing potency of the PG110 antibody tested in the concentration range of 10 ng/ml to 25 µg/ml for neutralization of either recombinant human NGF (rhNGF), recombinant rat NGF (rrNGF) or recombinant mouse NGF (rmNGF). In these experiments, 100% inhibition of survival was equivalent to the number of cells counted when cells were cultured without NGF, in the absence of anti-NGF antibody. Conversely, 0% inhibition was equivalent to the number of cells counted when cells were exposed to 5 ng/ml of the relevant NGF isoform, in the absence of anti-NGF antibody.

Incubation of cells in the presence of PG110 (10 ng/mL – 25 µg/mL) resulted in a concentration-dependant reduction in cell survival, with an IC_{50} between 10 and 50 ng/mL for all species of NGF homologues (n=1). These data demonstrate that PG110 inhibits the activity of NGF on sensory neurones.

D. Inhibition of PC12 Cell Neurite Outgrowth

PC12 is a rat phaeochromocytoma (chromaffin cell-derived tumor) cell line that expresses both rat TrkA and p75NTR receptors. When cultured on collagen-coated plates in the presence of NGF, PC12 cells differentiate into sympathetic-like neurones, becoming flat and extending outgrowths (neurites). Inhibition of NGF-mediated neurite outgrowth was employed as a semi-quantitative *in vitro* measure of the ability of PG110 to inhibit the interaction of NGF with the rat TrkA and p75NTR receptors.

PC12 cells (ECAAC 88022401) were primed (*i.e.*, pre-exposed to NGF) by washing 100,000 cells with serum-free medium (RPMI-1640 with Glutamax I, Gibco-Invitrogen 61870-010) and replating on collagen-treated plastic culture flasks (Type I collagen, BD 35-4236, was employed as a 0.5 mg/ml working solution) in RPMI-1640 with Glutamax-I containing 10% FBS and recombinant rat NGF (R&D Systems, Cat. No. 556-NG-100) (100 ng/ml). Before seeding, cells were gently passed at least 5 times through a 21G needle to disaggregate cell clumps. The medium containing NGF was removed and changed twice during the 1 week period of priming.

At the end of this period, primed PC12 cells were washed with serum-free medium and trypsinized (Trypsin-EDTA Euroclone, ECB3052D) for 2-3 minutes in a humidified incubator (5% CO_2, 37° C). Trypsin was blocked by addition of serum-containing medium and cells were centrifuged, washed with serum-free medium and resuspended in RPMI-1640 with Glutamax-I containing 10% FBS. Cells were gently passed at least 5 times through a 21G needle to disaggregate cell clumps before being replated on collagen-treated Petri dishes at a density of 50,000 cells/ml. Three dishes per assay condition were prepared. For antibody testing, a 2X incubation mixture (recombinant rat NGF + anti-NGF) was prepared 1 hour before addition to pre-seeded cells. The final concentration of NGF was 20 ng/ml, while the anti-NGF antibody was tested at four dilutions: 20 µg/ml, 2 µg/ml, 200 ng/ml and 20 ng/ml.

NGF-induced neurite outgrowth was scored after 72 hours. At that time, medium was removed and cells were washed with calcium- and magnesium-free PBS (GIBCO, 10010) and fixed for 30 minutes with 4% formaldehyde in PBS. Microscope images (20X magnification) were acquired using a Nikon Eclipse TE2000-E microscope and Leica IM1000 Image Manager Software. Inhibition of neurite outgrowth was evaluated and scores (++; +/-; --) were attributed based on the number of cells displaying a non-differentiated phenotype (= absence of clearly defined neurites).

Incubation of cells in the presence of PG110 (20 ng/mL – 20 µg/mL) inhibited NGF-mediated neurite outgrowth, with total inhibition evident at 200 ng/mL, highlighting that PG110 is an effective inhibitor of the interaction between rat recombinant NGF and its native rat neurotrophin receptors.

Example 4: ***In Vivo*** **Stability of Mutated Anti-NGF Antibody PG110**

In this example, the terminal elimination half life ($T_{1/2}$) of the PG110 antibody was determined *in vivo* in rats and in cynomolgus monkeys.

A. Rat Studies

Sprague-Dawley rats were given a 10-minute intravenous (IV) infusion of PG110 antibody at a dosage of 3 mg/kg, 30 mg/kg or 100 mg/kg on Study Days 1 and 56. Toxicokinetic data evaluation was performed using mean serum concentration and time points from 6 animals/time point in each group. The nominal blood collection times were: pre-dose and 0.25, 1, 3, 6 and 24 hours post-dose on Study Day 1 and 56 and also at 48, 96, 168, 336, 504, 672, 840, 1008 and 1176 hours post-dose on Study Day 1. Serum sample bioanalysis was performed by Alta Analytical Laboratory using a validated ELISA method. Pharmacokinetic data analysis was performed using SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System 2.0 with WinNonlin Professional version 4.0 software (Pharsight Corp.).

After IV administration, T_{max} values (the time to maximal serum concentration) ranged from 0.25 to 1 hour, the first two sample collection time points. All animals displayed biphasic disposition with terminal elimination half-lives of approximately 8 to 9 days. More specifically, the $T_{1/2}$, in hours, for the three treatment groups is summarized below in Table 4:

Table 4: Terminal Elimination Half Life of PG110 in Sprague-Dawley Rats

Dose Level (mg/kg)	Terminal Elimination Half-Life (hours)
3	217
30	192
100	207

Thus, the group mean half-life values ranged from 192-217 hours (8-9 days) in the rats.

B. First Monkey Study

Cynomolgus monkeys were given a single, approximately 30-minute, intravenous (IV) infusion of PG110 antibody at a dosage of 3 mg/kg, 30 mg/kg or 100 mg/kg. Animals were divided into males and females; each dose was tested on 2 males and 2 females (except only 1 female was tested at 30 mg/kg). The nominal blood

collection times for toxicokinetic data analysis were: immediately post-dose (within 2 minutes of the end of the infusion), 0.25, 1, 3, 6, 24, 48, 96, 168, 336, 504, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512 and 1680 hours post end of the infusion. Serum sample bioanalysis was performed by Alta Analytical Laboratory using a validated ELISA method. Pharmacokinetic data analysis was performed using SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System 2.0 with WinNonlin Professional version 4.0 software (Pharsight Corp.).

After IV administration, T_{max} values (the time to maximal serum concentration) measured from the start of infusion ranged from the end of the infusion to approximately 1.6 hours. All animals displayed biphasic disposition (with the exception of the one female treated with 30 mg/kg, who showed an abrupt decline after the 504 hour time point) with terminal elimination half-lives of approximately 15-22 days. More specifically, the $T_{1/2}$, in hours, for the six treatment groups is summarized below in Table 5:

Table 5: Terminal Elimination Half Life of PG110 in Cynomolgus Monkeys

Dose Level (mg/kg)	Sex	Terminal Elimination Half-Life (hours)
3	F (n=2)	370
	M (n=2)	531
30	F (n=1)	471
	M (n=2)	450
100	F (n=2)	383
	M (n=2)	461

Thus, the group mean half life values ranged from 370-531 hours (15-22 days) in the cynomolgus monkeys. Mean half life values generally were longer for males than for females, although given the small number of animals studied it is not clear whether this is a statistically significant difference.

C. Second Monkey Study

Cynomolgus monkeys were given weekly intravenous infusions of PG110 antibody over a period of four weeks. An approximately 30-minute, intravenous (IV) infusion of PG110 antibody, at a dosage of 3 mg/kg, 30 mg/kg or 100 mg/kg, was given on days 1, 8, 15 and 22. Animals were divided into males and females; each dose was tested on 3 males and 3 females. Serial blood samples were collected at the following nominal time points: pre-dose, immediately post-dose (within 2 minutes of the end of the infusion), 0.25, 1, 3, 6, 24 and 168 hours after infusion end on days 1 and 22.

Additional samples were collected from all animals pre-dose on day 15 and from recovery animals at 336, 504, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512, 1680, 1848, 2016 and 2208 hours following the final dose administration on day 22. Hours listed beginning at 24 hours after infusion correspond to pharmacokinetic days 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 and 92. All actual blood times were converted to begin from the start of the infusion.

Serum sample bioanalysis for PG110 concentration analysis was performed by Alta Analytical Laboratory using a validated ELISA method. Pharmacokinetic data analysis was performed using SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System 2.0 with WinNonlin Professional version 4.0 software (Pharsight Corp.).

After IV administration, the group mean T_{max} values (the time to maximal serum concentration) measured from the start of infusion ranged from approximately 0.6 hours to 2.6 hours. All animals displayed biphasic disposition, with terminal elimination half-lives of approximately 21-28 days (503 to 685 hours). More specifically, the $T_{1/2}$, in hours, for the six treatment groups is summarized below in Table 6:

Table 6: Terminal Elimination Half Life of PG110 in Cynomolgus Monkeys

Dose Level (mg/kg)	Sex	Terminal Elimination Half-Life (hours)
3	F (n=3)	503
	M (n=3)	564
30	F (n=3)	511
	M (n=3)	619
100	F (n=3)	532*
	M (n=3)	685

* based on n=2 value

Thus, the group mean half life values ranged from approximately 21-28 days in the cynomolgus monkeys. Mean half life values generally were longer for males than for females, although given the small number of animals studied it is not clear whether this is a statistically significant difference.

Example 5: Potency of PG110 Compared to Rat Precursor Antibody

In this example, additional experiments were performed using the TF1 cell proliferation assay (as described in Example 3B, above) to compare the NGF-neutralizing potency of PG110 with its precursor, rat αD11. The rat αD11 antibody was supplied as two separate batches, one at a stock concentration of 0.73 mg/ml and the other at a stock concentration of 0.63 mg/ml. The PG110 and rat αD11 antibodies were

evaluated in assays of TF1 cell proliferation mediated by human NGF or rat NGF, using the MTT cell proliferation kit (ATCC Cat. No. 30-1010K).

Before use in the assays, TF1 cells were cultured for one week in RPMI-1640 (ATCC cat. #30-2001) containing 10% fetal bovine serum (FBS, Cambrex DE14-801F, Lot 6SB0006) with 2 ng/ml GM-CSF (R&D Systems, cat. # 215-GM-50). Cells were washed, resuspended in RPMI-640 + 10% FBS to a concentration of 300,000 cells/ml and replated on 96-well microplates (15,000 cells/well, in 50 µl).

At least 60 minutes after addition to 96-well assay plates, cells were exposed to either human or mouse recombinant NGF (10 ng/ml) in culture medium (10% FBS in RPMI-1640; 50 µl/well) containing anti-NGF antibody. Medium containing NGF and test antibody was prepared at 2X final assay concentration, at least 30 minutes before being added to pre-seeded cells. Test antibodies were assayed in the concentration range 0.6 ng/ml to 24 µg/ml. Control wells were always included, either containing medium alone, or containing TF1 cells in the absence of NGF ("cellular blank"). Each treatment was performed in triplicate. After a 40 hour incubation period (37° C, 5% CO_2), 10 µl of MTT reagent was added before incubation for a further 4 hours at 37° C. Wells were subsequently incubated with Detergent Reagent (100 µl/well; gentle mixing) for overnight incubation at room temperature in the dark. Thereafter, absorbance was recorded at 570 nm. Final average OD values for triplicate measurements were calculated by subtraction of the average values for the cellular blank. Maximal inhibition was set corresponding to the average OD value observed for cells cultured without NGF, in the absence of test antibody. Zero inhibition was set corresponding to the average OD value observed for cells exposed to 10 ng/ml NGF in the absence of test antibody.

The inhibitory potencies of NGF antibodies were quantified as IC_{50} values (*i.e.*, the concentration of antibody required to reduce the NGF-mediated proliferative response by 50%) using GraphPad Prism v5.01 software. Inhibition curves were plotted individually in order to obtain discrete IC_{50} values for each test antibody in each experiment. Measures of cell proliferation were normalized with respect to maximum OD values obtained within that assay, in the absence of added test antibody. Normalized responses were then plotted against test antibody concentration on a log scale, and IC_{50} values were derived using the GraphPad Prism nonlinear curve fitting function 'log(inhibitor) vs response – variable slope'.

The inhibitory effect of PG110 as compared to its precursor antibody rat αD11 is summarized below in Table 7.

Table 7: Summary of IC50 Values (ng/ml) in TF1 Cell Proliferation Assay

Antibody	Human NGF			Rat NGF		
	Geomean	95% CI	n	Geomean	95% CI	n
PG110	27.0	25.8-28.3	2	26.2	13.6-50.4	2
Rat αD11 (Batch 1)	63.7	35.7-114	3	44.8	31.4-64.1	3
Rat αD11 (Batch 2)	107	-	1	54.9	-	1

The results indicate that the PG110 antibody has approximately 2-fold higher potency in neutralizing NGF activity as compared to its precursor antibody rat αD11. Furthermore, the potency values obtained for rat αD11 batch 2 suggest that this batch may have a lower potency than the batch 1 material.

Example 6: Anti-NGF Antibody PG110 Does Not Exhibit a Rebound Effect in an Animal Model

In this example, a rat skin lesion model was used to examine the activity of the PG110 mAb. The rat skin lesion model was developed based on the observations that rats treated with anti-NGF antibody develop a pruritic response, with a dose-dependent increase in scratching being observed. The lesioning was not associated with reduction of innervation to the epidermis. Furthermore, the rats exhibited fast recovery after elimination of the antibody. This skin lesion activity has only been observed in rodents, who have a grooming behaviour. Although not intending to be limited by mechanism, it is hypothesized that in the anti-NGF-treated rats there is continued grooming due to an impaired feedback loop to stop the scratching response, which results in cutaneous injury. The skin lesions can then be given a quantitative score as a measure of the activity of the anti-NGF antibody in the rats.

In various clinical studies on the activity of anti-NGF antibodies (such as the humanized antibody RN-642, described further in U.S. Patent Publication No. 20040237124 and Abdiche, Y.N. *et al.* (2008) *Protein Sci.* 17:1326-1335), it has been reported that the effectiveness of the antibody diminishes for a period after a dosing (*e.g.*, days 14-21 after dosing), followed by a recovery of activity of the antibody. There are reports of increased pain and/or increased adverse events (such as abnormal

sensations, ranging from allodynia to tingling, prickling or pins & needles sensation) during this period after a dosing in which the antibody activity diminishes. This diminishing of antibody activity for a period of time after a dosing is referred to herein as a "rebound effect."

To evaluate the effect of PG110 antibody on grooming and scratching behaviours in conscious rats, male and female Sprague Dawley rats were treated with PG110 mAb (0.003, 0.01, 0.03, 0.3 or 3 mg/kg), administered as an i.v. bolus, or with a vehicle control. The rats received one weekly dose for four weeks. The evaluation criteria were: number of grooming and scratching episodes, body temperature, latency to paw licking, latency to jump (attempts to escape) and number and severity score of skin lesions over time.

The results indicated that no skin lesions were observed in rats administered with vehicle, whereas in the groups of rats administered with PG110, skin lesions were observed in all animals at all antibody dosages tested. Moreover, the number and severity of skin lesions increased over time and increased with increasing dosages of antibody. The number of scratching episodes also was increased in the antibody-treated animals, but antibody treatment did not have any effect on grooming behaviour, body temperature, latency to paw licking or latency to jump (attempts to escape).

The severity of the skin lesions was quantitated using a lesion score, which equals the number of lesions multiplied by the area (in mm^2) of the lesions. The lesion scores over time for PG110 treatment, compared to vehicle, are shown in the graph of Figure 4. The results showed that the PG110-treated rats showed a steady increase in the lesion scores over time, in particular at the higher doses tested (0.3 mg/kg and 3 mg/kg). That is, the antibody did not exhibit a significant rebound effect over the course of the experiment, suggesting that it may be possible to select dosage and administration frequency parameters for use in humans such that a rebound effect can be avoided.

Thus, in summary, the rat skin lesion model illustrates an advantage of the PG110 anti-NGF antibody in that the PG110 antibody did not exhibit a noticeable rebound effect, which has been reported for other anti-NGF antibodies, suggesting that PG110 exhibits a more consistent and prolonged activity *in vivo*. Although not intended to be limited by mechanism, it is thought that this ability of PG110 to avoid a rebound effect *in vivo* is related to the prolonged terminal elimination half life observed for this antibody.

Example 7: PG110 Human Pharmacokinetics

PG110 is expected to have a half life in humans of about 10-30 days (range 10 to 40 days) with a multiphasic disposition. Based on a target C_{min} value of ~0.25 µg/mL

(range ~0.13 µg/mL to 0.40 µg/mL), human IV doses of 10 mg (~0.15 mg/kg; range ~0.1 mg/kg [5 mg] to ~0.2 mg/kg [15 mg]) every 4-12 weeks and SC doses of 20 mg (~0.3 mg/kg; range ~0.2 mg/kg [15 mg] to ~0.4 mg/kg [30 mg]) every 4-12 weeks are expected to be efficacious.

Human pharmacokinetics projections were based on the concentration data from two species (rat and monkey). Human pharmacokinetics were projected using multiple methods that included scaling of monkey and rat pharmacokinetic parameters, fixed allometric scaling, and methods based on preclinical and clinical data from other monoclonal antibodies. Projections were performed for both mono and biphasic disposition.

Method 1: Human pharmacokinetic projections were based on 2-compartment model fitting PG110 concentration-time profiles in two species (rat and monkey). Human pharmacokinetic parameters of PG110 were projected using allometric scaling with fixed exponents of monkey and rat pharmacokinetic parameters.

For clearance:

$$CL_{human} = CL_{animal} \bullet \left(\frac{BW_{human}}{BW_{animal}} \right)^{0.67}$$

For volume of distribution:

$$V_{human} = V_{animal} \bullet \frac{BW_{human}}{BW_{animal}}$$

Table 8. Human Pharmacokinetic Parameters Predictions Based on Allometric Scaling with Fixed Exponents

	V_1 mL/kg	CL mL/hr/kg	V_2 mL/kg	CL_D mL/hr/kg
	Model-Fitted Pharmacokinetic Parameters			
Rat	40.2	0.22	36.5	2.23
Monkey	29.3	0.10	31.1	1.78

	Predicted Human Pharmacokinetic Parameters			
Predicted Human Value Based on Rat	40.2	0.034	36.5	0.35
Predicted Human Value Based on Monkey	29.3	0.042	31.1	0.75
Average	34.7	0.038	33.8	0.55

PG110 human half-life is then calculated based on the predicted human CL and V_1. The predicted PG110 human half-life was 26 days.

Method 2: Human pharmacokinetic projections were based on the observed data from two species (rat and monkey). Human CL and V were projected using the same method as in *Method 1*. Human half-life for PG110 was projected using modified allometric scaling with fixed exponent at 0.25:

$$T_{1/2,human} = T_{1/2,animal} \cdot \left(\frac{BW_{human}}{BW_{animal}} \right)^{0.25}$$

Table 9. Human Pharmacokinetic Parameters Predictions Based on Modified Allometric Scaling with Fixed Exponent

	CL (mL/hr/kg)		V_{ss} (mL/kg)		$t_{1/2}$ (days)	
	Rat	Monkey	Rat	Monkey	Rat	Monkey
PG110 Observed	0.22	0.098	70	60	8.6	19.1
Predicted Human Values	0.0343	0.0410	70	60	35.2	37
Predicted Human Values (Average)	0.0376		65		36	

Using *Method 2*, the predicted PG110 human half-life was 36 days.

Method 3: Human pharmacokinetic projections were based on PG110 data in rat and monkey and the preclinical and clinical pharmacokinetic parameters from other monoclonal antibodies. Scaling was based on observed PG110 half life in rats and monkeys and on the rat/human and monkey/human ratio of half life of other monoclonal antibodies. Estimated pharmacokinetic parameters (clearance, volume of distribution and half-life) of other monoclonal antibodies in rat and monkey were first compared to those in clinical studies. The differences between rat, monkey and human were estimated as a ratio of rat/human and monkey/human. Human pharmacokinetic parameters for PG110 were then estimated based on its pharmacokinetic parameters in rat or monkey with a correction of rat/human or monkey/human ratio for other monoclonal antibodies. Using *Method 3*, the predicted PG110 human half-life was 11-29 days.

Table 10. Human Pharmacokinetic Parameters Predictions Based on Past Experience with Other Monoclonal Antibodies

	CL (mL/hr/kg)		V_{ss} (mL/kg)		$t_{1/2}$ (days)	
	R/H	M/H	R/H	M/H	R/H	M/H
Antibody 1	1.35	1.88	1.33	0.53	0.93	0.69
Antibody 2	3.57	1.43	1.65	0.72	0.44	0.49
Antibody 3	1.58	1.46	1.35	0.71	1.05	0.78
Average	2.17	1.59	1.45	0.65	0.81	0.65
	Rat	Monkey	Rat	Monkey	Rat	Monkey
PG110 Observed	0.22	0.098	70	60	8.6	19.1
Predicted Human Values	0.101	0.062	48.4	92.0	11	29

R/H: rat/human, M/H: monkey/human

Method 4: Human pharmacokinetic projections were based on 2-compartment model fitting PG110 concentration-time profiles in two species (rat and monkey). Human pharmacokinetic parameters of PG110 were projected using allometric scaling with regression of monkey and rat pharmacokinetic parameters.

For both clearance and volume of distribution:

$$Log\,(Pharmacoki\,netic\;\;Parameter\,) = a \times Log\,(BW\,) + b$$

A linear regression was conducted based on rat and monkey pharmacokinetic parameters and body weight (BW) to estimate the slope (a) and intercept (b). Human pharmacokinetic parameters of PG110 were then estimated using typical human BW and the estimated slope and intercept.

Table 11. Human Pharmacokinetic Parameters Predictions Based on Allometric Scaling with Regression

	BW	**LnBW**	**V1**	**CL**	**V2**	**CL_D**
	kg	kg	**mL**	**mL/hr**	**mL**	**mL/hr**
Rat	0.25	-1.387	2.307	-2.907	2.210	-0.585
monkey	5	1.609	4.988	-0.680	5.047	2.188
	Estimated slope and Intercept Based on Linear Regression					
Slope			0.8949	0.7432	0.947	0.9255
Intercept			3.5475	-1.8766	3.523	0.6982
			Predicted Human Pharmacokinetic Parameters			
Human	70	4.248	1555	3.600	1894	103

PG110 human half-life is then calculated based on the predicted human pharmacokinetic parameters. The predicted PG110 human half-life was 12 days.

Based on these methods, PG110 is expected to have a half life in humans of about 15-30 days (range 10 to 40 days) with a biphasic disposition (predicted pharmacokinetic parameters: V_1=2.5 L, CL=5.0 mL/hr, V_2=2.5 L, CL_D=40 mL/hr).

Example 8: Treatment of Osteoarthritis in Humans with PG110

A human clinical study was initiated to test the safety, tolerability, and pharmacokinetics of PG110 in patients with pain attributed to osteoarthritis of the knee. The design of the study and preliminary results are described below.

In this Phase I, single centre, placebo-controlled, double-blind, single ascending dose study, six (6) dose levels were evaluated: 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 and 1 mg/kg. Per dose level, a cohort of 7 patients with pain attributed to osteoarthritis of the knee (42 patients in total) were randomly assigned in a 6:1 ratio to active or placebo treatment. Each patient was administered a single dose of PG110 or placebo intravenously over 2 h interval on the morning of Day 0 after a light breakfast. Patients remained at the Clinical Pharmacology Unit (CPU) until approximately 24 h after start of infusion (Day 1) and returned for visits on Days 4, 7, 14, 21, 28, 56 and 84 of the study.

Blood samples for PG110 assay were taken on Day 0 (pre-dose, 1, 2, 3, 6 and 12 hours) and on Days 1, 4, 7, 14, 21, 28, 56 and 84 post-dose. Serum concentrations of PG110 were determined using a validated ELISA assay. Anti-PG110 assays were also performed on Days 0 (pre-dose), 14, 28, 56 and 84 samples.

Pharmacodynamic assessments, including patient assessment of pain, Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC™) Osteoarthritis Index questionnaire, McGill pain questionnaire, 6-Minute Walk Test, Ultrasound of the knee and hs-CRP, were conducted in the study.

Preliminary results for patient assessment of pain are summarized in Table 12. A patient assessment of pain was used as an assessment of pain intensity. The patients were asked to score their answer on a 0-100 mm VAS where 0 mm equals no pain and 100 mm equals worst pain.

Table 12. PG110 in OA Patients: Patient Assessment of Pain (VAS)

	Patient Assessment of Pain (VAS, mm, Change from Baseline) (Mean ± SD)					
Time (Day)	Placebo	0.003 mg/kg	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg
4	-7.2 ± 13.1	-15.8 ± 23.0	-22.8 ± 28.6	-16.5 ± 17.5	-23.0 ± 17.6	-31.7 ± 18.2
7	-10.2 ± 12.1	-14.8 ± 23.4	-12.3 ± 25.9	-26.0 ± 17.2	-34.8 ± 20.3	-32.5 ± 18.2
14	-10.6 ± 14.3	-29.7 ± 15.8	-12.5 ± 21.7	-15.5 ± 22.7	-24.3 ± 28.3	0.5 ± 17.2
21	-11.2 ± 24.1	-30.5 ± 23.9	-16.3 ± 24.9	-25.5 ± 24.1	-23.3 ± 40.7	-20.0 ± 18.5
28	-9.6 ± 11.9	-28.3 ± 25.9	-16.5 ± 22.8	-30.7 ± 22.5	-45.2 ± 22.4	-35.3 ± 20.5
56	0.5 ± 15.0	-24.3 ± 25.8	-11.8 ± 19.8	-24.0 ± 19.8	-48.8 ± 23.7	-52.8 ± 19.3
84	-7.8 ± 16.4	-25.0 ± 20.7	-9.2 ± 18.2	-21.0 ± 23.2	-29.3 ± 37.1	-34.0 ± 26.0
Maximum Patient Assessment of Pain (VAS, mm)	-22.4 ± 13.0	-41.0 ± 14.5	-30.2 ± 25.3	-37.2 ± 17.7	-48.8 ± 23.7	-55.3 ± 13.7

Based on the preliminary pharmacodynamic data, an apparent dose-response was observed in the 0 to 0.3 mg/kg PG110 dose range.

The pharmacologic half-life was estimated based on the average amount of time to maintain drug effect (MRT for drug effect). It is calculated as the ratio of area of the first moment baseline-corrected effect-time curve (AUMEC) vs. accumulated baseline-corrected drug effect over time (area under the effect-time curve, AUEC):

$$\text{Pharmacolo gic Half- life} = \frac{\text{AUMEC}}{\text{AUEC}} = \frac{\int E(t)tdt}{\int E(t)dt}$$

The estimated pharmacologic half-lives are summarized in Table 13.

Table 13. Pharmacologic Half-life for PG110

	PG110 Dose				
	0.003 mg/kg	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg
Pharmacologic Half-life (Mean ± SD) (Day)	43.0 ± 7.5	30.9 ± 21.6	35.8 ± 17.9	42.7± 5.0	41.9 ± 5.4

Estimation of the pharmacologic half-life was based on data collected up to 84 days post PG110 dose. As there was still sustained effect of PG110 at Day 84,

especially at 0.1 mg/kg and 0.3 mg/kg dose, the estimated mean pharmacologic half-life for PG110 is at least 5-7 weeks, with a range of at least 4-8 weeks.

The preliminary pharmacodynamic data are consistent with the projected therapeutic dose (0.10 to 0.3 mg/kg or 7-21 mg). The preliminary pharmacologic half-life suggests that every 4-12 week dosing may be effective.

Equivalents

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents of the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims. Any combination of the embodiments disclosed in the dependent claims are contemplated to be within the scope of the invention.

Incorporation by Reference

All publications, patents, and pending patent applications referred to herein are hereby incorporated by reference in their entirety.

SUMMARY OF SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO: 1 (PG110 V_H)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNSALKSRFTISRD
NSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 2 (PG110 V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDYT
LTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 3 (PG110 V_H CDR 1)

GFSLTNNNVN

SEQ ID NO: 4 (PG110 V_H CDR 2)

GVWAGGATDYNSALKS

SEQ ID NO: 5 (PG110 V_H CDR 3)

DGGYSSSTLYAMDA

SEQ ID NO: 6 (PG110 V_L CDR 1)

RASEDIYNALA

SEQ ID NO: 7 (PG110 V_L CDR 2)

NTDTLHT

SEQ ID NO: 8 (PG110 V_L CDR 3)

QHYFHYPRT

SEQ ID NO: 9 (wild type human IgG4 constant region)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 10 (serine to proline mutated human IgG4 constant region)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 11 (PG110 complete heavy chain nucleotide sequence, including signal sequence)

ATGGAATGGAGCTGGGTGTTCCTGTTCTTCCTGAGCGTGACCACCGGCGTGCACAGCGAGGTGC
AGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCCGC
CAGCGGCTTCAGCCTGACCAACAACAACGTGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTG
GAATGGGTGGGCGGCGTGTGGGCCGGGGGAGCCACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGT
TCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGA
GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGGCGGCTACAGCAGCAGCACCCTGTACGCCATG
GACGCCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGT
TCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA
GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGGGTGCAC
ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCA
GCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCACCCTGCCCCCCATGCCCAGCCCCCGAGTTCCTG
GGCGGACCCTCCGTGTTTCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC
CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCAGAGGTCCAGTTCAACTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTTAACAGCACC
TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCTCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA
GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCACCCTCCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG
GCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCT
GTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGAGCCTGGGCAAGTGA

SEQ ID NO: 12 (PG110 complete heavy chain amino acid sequence, including signal sequence)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWA
GGATDYNSALKSRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS

QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 13 (PG110 mature heavy chain amino acid sequence, excluding signal sequence)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNSALKSRFTISRD
NSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 14 (PG110 complete light chain nucleotide sequence, including signal sequence)

ATGAGCGTGCCCACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACA
TCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTG
CAGGGCCAGCGAGGACATCTACAACGCCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC
AAGCTGCTGATCTACAACACCGACACCCTGCACACCGGCGTGCCCAGCAGGTTCAGCGGCAGCG
GCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTT
TTGCCAGCACTACTTCCACTACCCCAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGG
ACCGTGGCTGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCG
CCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA
CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC
TACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT
GCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGCTG
A

SEQ ID NO: 15 (PG110 complete light chain amino acid sequence, including signal sequence)

MSVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTD
TLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 16 (PG110 mature light chain amino acid sequence, excluding signal sequence)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDYT
LTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

We claim:

1. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days or has a mean pharmacologic half-life in humans of at least 30 days.

2. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days or has a mean pharmacologic half-life in humans of at least 30 days.

3. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a human IgG4 constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days or has a mean pharmacologic half-life in humans of at least 30 days.

4. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a human IgG4 constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days or has a mean pharmacologic half-life in humans of at least 30 days.

5. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and

(iii) a constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days or has a mean pharmacologic half-life in humans of at least 30 days.

6. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days or has a mean pharmacologic half-life in humans of at least 30 days.

7. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less, and wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days or has a mean pharmacologic half-life in humans of at least 30 days.

8. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

9. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

10. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a human IgG4 constant region, comprising a hinge region mutation, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

11. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a human IgG4 constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

12. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, (ii) a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively, and (iii) a constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

13. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1, (ii) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, and (iii) a constant region comprising a hinge region mutation, wherein the antibody binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less, inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$ with an IC_{50} of 250 pM or less, and inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells with an IC_{50} of 50 ng/ml or less.

14. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody having a human IgG4 constant region, said human IgG4 constant region containing a hinge region mutation comprising the mutation of serine at the amino acid position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9.

15. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a mutation, and wherein the antibody has a mean terminal elimination half-life in humans of at least 10-30 days or has a mean pharmacologic half-life in humans of at least 30 days.

16. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a mutation and wherein the antibody has a terminal elimination half-life in a cynomolgus monkey of at least 15 days.

17. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which has a terminal elimination half-life in a cynomolgus monkey in a range of about 15 days to about 28 days.

18. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which has a terminal elimination half-life in a rat of at least 8 days.

19. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, wherein the mutation is a hinge region mutation.

20. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, wherein the hinge region mutation comprises mutation of serine at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9.

21. The anti-NGF antibody of claim 20, wherein the serine at the amino acid position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 is mutated to proline.

22. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10.

23. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which has one or more of the following functional properties:

a) binds to human NGF but does not bind to human brain-derived neurotrophic factor (BDNF), human neurotrophin 3 (NT-3) or human neurotrophin 4 (NT-4);

b) binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less;

c) inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$;
d) inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells;
e) inhibits NGF-dependent chick dorsal root ganglion survival;
f) inhibits NGF-dependent PC12 cell neurite outgrowth.

24. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which does not exhibit a rebound effect when administered to a subject.

25. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which alleviates pain for a duration of at least about four weeks to about twelve weeks after administration of a single dose the anti-NGF antibody to a subject.

26. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively.

27. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which comprises a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively.

28. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, and which comprises a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively.

29. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

30. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

31. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

32. The anti-NGF antibody of any one of the preceding claims, which competes for binding to NGF with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising

the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

33. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a hinge region mutation, wherein the antibody has a terminal elimination half-life in a human of at least 10-30 days or has a mean pharmacologic half-life in humans of at least 30 days, and wherein the antibody alleviates pain for a duration of at least about four weeks to about twelve weeks after administration of a single dose the antibody to a human subject.

34. The anti-NGF antibody of claim 33, wherein the hinge region mutation comprises mutation of serine at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9.

35. The anti-NGF antibody of claim 34, wherein the serine at the amino acid position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 is mutated to proline.

36. The anti-NGF antibody of claim 35, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10.

37. The anti-NGF antibody of claim 33, which has one or more of the following functional properties:

a) binds to human NGF but does not bind to human brain-derived neurotrophic factor (BDNF), human neurotrophin 3 (NT-3) or human neurotrophin 4 (NT-4);

b) binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less;

c) inhibits binding of NGF to TrkA or $p75^{NTR}$;

d) inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells;

e) inhibits NGF-dependent chick dorsal root ganglion survival;

f) inhibits NGF-dependent PC12 cell neurite outgrowth.

38. The anti-NGF antibody of claim 33, which competes for binding to NGF with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

39. The anti-NGF antibody of claim 33, which alleviates pain for a duration of at least twelve weeks after administration of a single dose the antibody to a human subject.

40. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13, wherein the antibody has a serum half-life in a human of at least 10-30 days or has a mean pharmacologic half-life in humans of at least 30 days.

41. The anti-NGF antibody of claim 40, wherein the heavy chain is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11.

42. The anti-NGF antibody of claim 40 or 41, which comprises a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16.

43. The anti-NGF antibody of claim 42, wherein the light chain is encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 14.

44. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the antibody comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13 and a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16.

45. An anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the antibody comprises a heavy chain encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11. and a light chain encoded by the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 14.

46. The ant-NGF antibody of any one of the preceding claims, wherein the antibody is chimeric, humanized or human, or an antibody in which potential T cell epitopes have been eliminated.

47. A pharmaceutical composition comprising the anti-NGF antibody of any one of claims 1-46 and a pharmaceutically acceptable carrier.

48. A kit comprising the anti-NGF antibody of any one of claims 1-46 and instructions for use of the antibody in treating an NGF-related disease or condition.

49. A method of attenuating or inhibiting an NGF-related disease or condition in a subject, the method comprising administering to the subject the anti-NGF antibody of any one of claims 1-46.

50. The method of claim 49, wherein the NGF-related disease or condition is pain.

51. The method of claim 50, wherein the pain is selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain, pain from bone metastases, interstitial cystitis, painful bladder syndrome, pain associated with chronic abacterial prostatitis, pain associated with endometriosis, pain associated with uterine fibroids and post-operative pain.

52. The method of any one of claims 49-51, wherein the anti-NGF antibody is administered at a dose in a range from 0.1 mg/kg to 3 mg/kg..

53. The method of any one of claims 49-52, wherein the antibody is administered intravenously.

54. The method of any one of claims 49-52, wherein the antibody is administered subcutaneously or intra-articularly.

55. The method of any one of claims 49-54, wherein a second pharmaceutical agent is administered to the subject.

56. The method of claim 55, wherein the second pharmaceutical agent is selected from the group consisting of NSAIDs, analgesics including opioid analgesics and atypical analgesics, local anaesthetics, nerve blocks, phenol blocks, therapeutic antibodies, steroids, anti-convulsants, anti-depressants, topical capsaicin, antiviral agents, TrkA inhibitors and PKC inhibitors.

57. A method of attenuating or inhibiting pain in a subject, the method comprising administering to the subject an anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, and wherein the antibody alleviates pain in the subject for a duration of at least about four weeks to about twelve weeks after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject.

58. The method of claim 57, wherein the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, and a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively.

59. The method of claim 57 or 58, wherein the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

60. The method of any one of claims 57-59, wherein the pain is selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain, pain from bone metastases, interstitial cystitis, painful bladder syndrome, pain associated with chronic abacterial prostatitis, pain associated with endometriosis, pain associated with uterine fibroids and post-operative pain.

61. The method of any one of claims 57-60, wherein the anti-NGF antibody is administered at a dose in a range from 0.1 mg/kg to 3 mg/kg.

62. The method of any one of claims 57-61, wherein the antibody is administered intravenously or subcutaneously.

63. A method of attenuating or inhibiting a nerve growth factor (NGF)-related disease or condition in a subject such that a rebound effect is avoided in the subject, the method comprising administering to the subject an anti-NGF antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a hinge region mutation, and wherein the antibody has a terminal elimination half-life in a human of at least 10-30 days or has a mean pharmacologic half-life in humans of at least 30 days, and wherein the antibody is administered at a dosage and at a frequency such that a rebound effect is avoided in the subject.

64. The method of claim 63, wherein the human IgG4 constant region comprises a mutation at the amino acid position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9.

65. The method of claim 64, wherein the serine at the amino acid position corresponding to amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 is mutated to proline.

66. The method of any one of claims 63-65, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10.

67. The method of any one of claims 63-66, wherein the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino

acid sequences of SEQ ID NOs: 3, 4 and 5, respectively, and a light chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 6, 7 and 8, respectively.

68. The method of any one of claims 63-67, wherein the anti-NGF antibody comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

69. The method of any one of claims 63-67, wherein the antibody competes for binding to NGF with an antibody comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

70. The method of any one of claims 63-69, wherein the NGF-related disease or condition is pain selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain, pain from bone metastases, interstitial cystitis, painful bladder syndrome, pain associated with chronic abacterial prostatitis, pain associated with endometriosis, pain associated with uterine fibroids and post-operative pain.

71. The method of any one of claims 63-70, wherein the anti-NGF antibody is administered at a dose in a range from 0.1 mg/kg to 3 mg/kg.

72. The method of any one of claims 63-71 wherein the antibody is administered intravenously or subcutaneously.

73. The anti-NGF antibody of any one of claims 1-46 for use in treating an NGF-related disease or condition.

74. The anti-NGF antibody of claim 73, wherein the NGF-related disease or condition is pain.

75. The anti-NGF antibody of claim 74, wherein the pain is selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain, pain from bone metastases, interstitial cystitis, painful bladder syndrome, pain associated with chronic abacterial prostatitis, pain associated with endometriosis, pain associated with uterine fibroids and post-operative pain.

76. Use of the anti-NGF antibody of any one of claims 1-46 for the manufacture of a medicament for use to attenuate or inhibit an NGF-related disease or condition in a subject.

77. The use of claim 76, wherein the NGF-related disease or condition is pain.

78. The use of claim 77, wherein the pain is selected from the group consisting of osteoarthritis pain, chronic low back pain, diabetic neuropathic pain, cancer pain, pain from bone metastases, interstitial cystitis, painful bladder syndrome, pain associated with chronic abacterial prostatitis, pain associated with endometriosis, pain associated with uterine fibroids and post-operative pain.

79. Use of the anti-NGF antibody of any one of claims 1-46 for the manufacture of a medicament for use to attenuate or inhibit pain in a subject, such that pain is attenuated or inhibited in the subject for a duration of at least about four weeks to about twelve weeks after administration of a single dose of the anti-NGF antibody to a subject.

80. Use of the anti-NGF antibody of any one of claims 1-46 for the manufacture of a medicament for use to attenuate or inhibit an NGF-related disease or condition in a subject such that a rebound effect is avoided in the subject.

81. An expression vector encoding an anti-nerve growth factor (NGF) antibody, wherein the vector comprises the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11 encoding an antibody heavy chain and the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 14 encoding an antibody light chain.

82. A host cell comprising the expression vector of claim81.

83. A method of expressing an anti-NGF antibody comprising culturing the host cell of claim 82 such that an anti-NGF antibody comprising a heavy chain encoded by SEQ ID NO: 11 and a light chain encoded by SEQ ID NO: 14 is expressed.

FIG.1

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

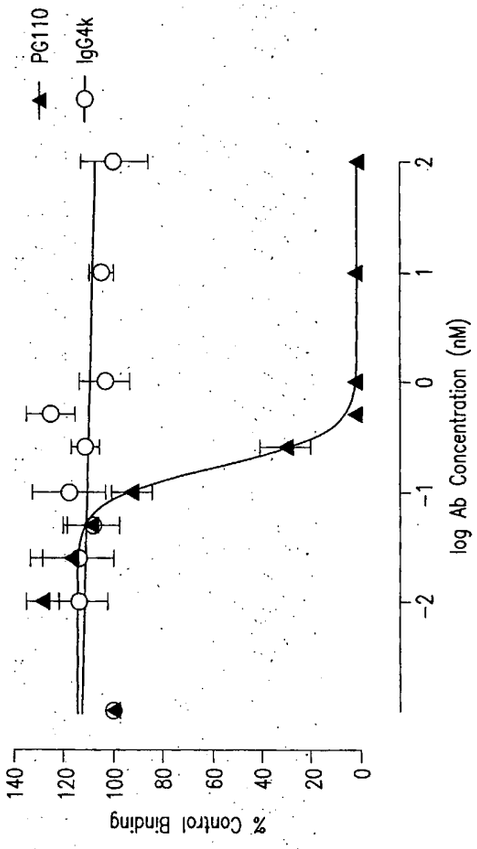

PG110
IgG4k
% Control Binding
140
120
100
80
60
40
20
0
log Ab Concentration (nM)
−2
−1
0
1
2

FIG.2A

FIG.2B

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

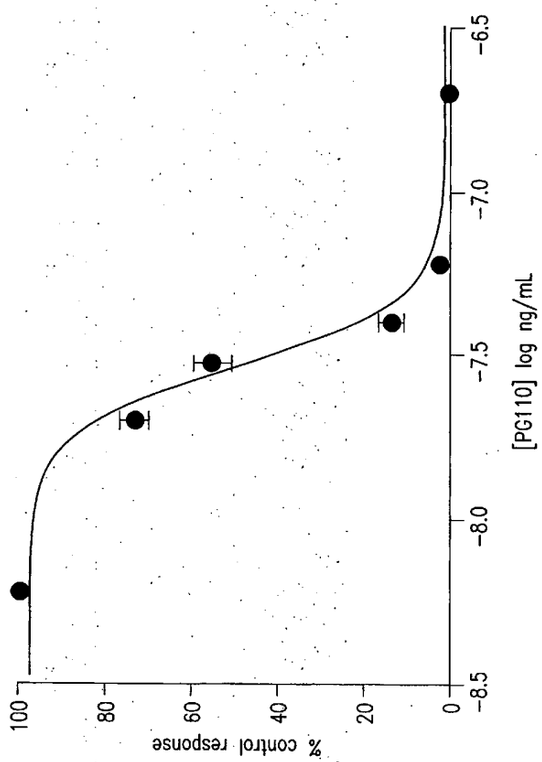


FIG.3A

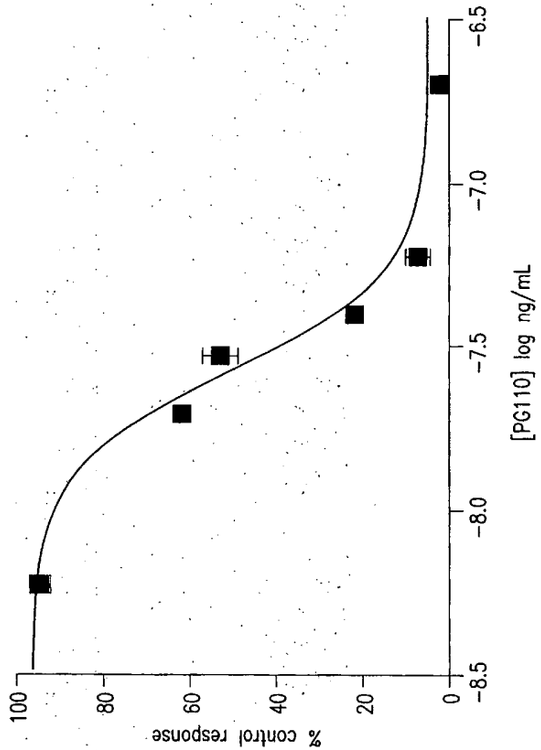


FIG.3B

FIG.3C

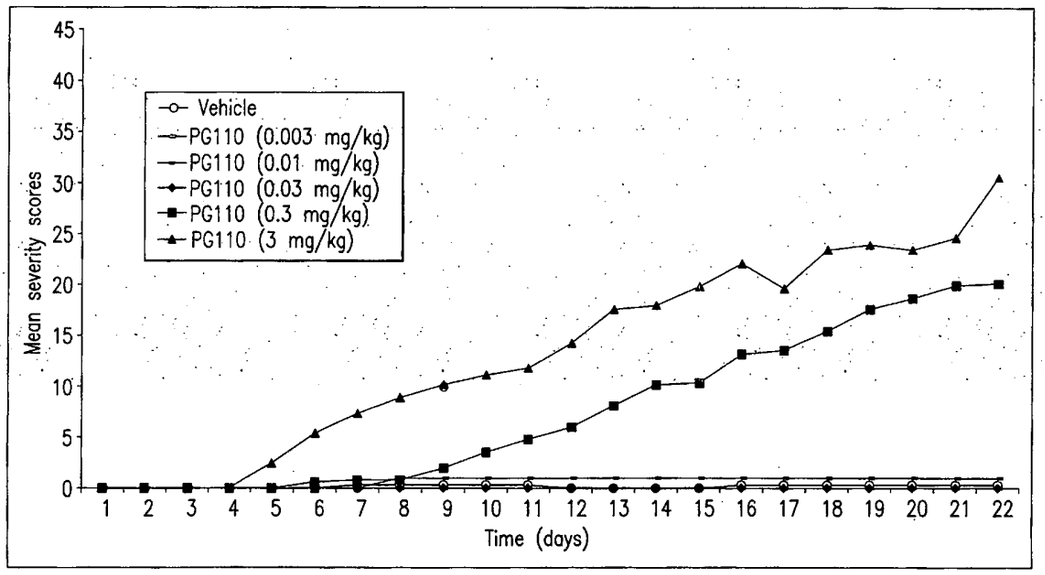


FIG.4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

000110

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PANGENETICS 110, BV

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

<130> PNJ-013PC

<140> Nueva Solicitud
<141> Concurrentemente Con Esta

<150> 61/252,314
<151> 2009-10-16

<150> 61/238,813
<151> 2009-09-01

<150> 61/227,251
<151> 2009-07-21

<150> 61/175,228
<151> 2009-05-04

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

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

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 3
Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn Asn Val Asn

000112

1 5 10

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 4
Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 5
Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 6
Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 7
Asn Thr Asp Thr Leu His Thr
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 8
Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg Thr
1 5

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

<400> 9
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                325
```

<210> 10
<211> 327
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
```

260 265 270

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 11
<211> 1407
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 11
atggaatgga gctgggtgtt cctgttcttc ctgagcgtga ccaccggcgt gcacagcgag 60

gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagccag gcggcagcct gaggctgtcc 120

tgcgccgcca gcggcttcag cctgaccaac aacaacgtga actgggtgcg gcaggcccca 180

ggcaagggcc tggaatgggt gggcggcgtg tgggccgggg gagccaccga ctacaacagc 240

gccctgaaga gcaggttcac catcagcagg gacaacagca agaacaccgc ctacctgcag 300

atgaacagcc tgagggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cggcggctac 360

agcagcagca ccctgtacgc catggacgcc tggggccagg gcaccctggt gaccgtgagc 420

agcgccagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc cctgcagcag aagcaccagc 480

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 540

tcctggaaca gcggagccct gaccagcggg gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 600

agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggcaccaag 660

acctacacct gcaacgtgga ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagggtggag 720

agcaagtacg gcccaccctg ccccccatgc ccagcccccg agttcctggg cggaccctcc 780

gtgtttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccgaggtg 840

acctgcgtgg tggtggacgt gagccaggaa gatccagagg tccagttcaa ctggtacgtg 900

gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagtt taacagcacc 960

tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020

aagtgcaagg tctccaacaa gggcctgccc agctccatcg agaaaaccat cagcaaggcc 1080

aagggccagc cacgggagcc ccaggtgtac accctgccac cctcccagga agagatgacc 1140

aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct accccagcga catcgccgtg 1200

gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccacccccc agtgctggac 1260

agcgacggca gcttcttcct gtacagcagg ctgaccgtgg acaagtccag gtggcaggaa 1320

ggcaacgtct ttagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1380

agcctgtccc tgagcctggg caagtga 1407

<210> 12
<211> 468
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
```

370 375 380

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

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

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

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

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

Ser Leu Gly Lys
465

<210> 13
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

000120

```
Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
        115                 120                 125

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145                 150                 155                 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
                165                 170                 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
            180                 185                 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
        195                 200                 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
    210                 215                 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 14
<211> 705
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<22i> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 14
atgagcgtgc ccacccaggt gctgggcctg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc 60

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagggtgacc 120

atcacctgca gggccagcga ggacatctac aacgccctgg cctggtatca gcagaagccc 180

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac accgacaccc tgcacaccgg cgtgcccagc 240

aggttcagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 300

gaggacttcg ccacctactt ttgccagcac tacttccact accccaggac cttcggccag 360

ggcaccaagg tggagatcaa gaggaccgtg gctgccccca gcgtgttcat cttcccccca 420

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 480

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 540

gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 600

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gctga 705

<210> 15
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 16
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2010/001210

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/22 A61K39/395 C12N5/10 C12N15/13 A61P25/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/023540 A1 (REGENERON PHARMA [US]; REINHARDT JOEL C [US]; MACDONALD LYNN [US]; TOR) 19 February 2009 (2009-02-19) tables 1,8; sequence 543	14
A	WO 2006/131951 A2 (LAY LINE GENOMICS S P A [IT]; PAVONE FLAMINIA [IT]; MARTINELLI SARA [I) 14 December 2006 (2006-12-14) paragraph [0067]	1-83

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 September 2010	10/09/2010

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Vadot, Pierre

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2010/001210

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. (means)

   - [ ] on paper
   - [X] in electronic form

   b. (time)

   - [X] in the international application as filed
   - [ ] together with the international application in electronic form
   - [ ] subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2010/001210

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009023540 A1	19-02-2009	AU 2008287037 A1	19-02-2009
		CA 2695997 A1	19-02-2009
		CR 11298 A	23-03-2010
		EC SP100029 A	30-04-2010
		EP 2187964 A1	26-05-2010
		KR 20100058537 A	03-06-2010
		US 2009041717 A1	12-02-2009
WO 2006131951 A2	14-12-2006	AU 2006256387 A1	14-12-2006
		CA 2610596 A1	14-12-2006
		CA 2611433 A1	14-12-2006
		CN 101277718 A	01-10-2008
		EP 1893234 A2	05-03-2008
		EP 1890726 A1	27-02-2008
		WO 2006131952 A1	14-12-2006
		JP 2008542439 T	27-11-2008
		JP 2008542440 T	27-11-2008
		KR 20080026593 A	25-03-2008
		US 2009208490 A1	20-08-2009

ANTICUERPOS CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF) CON ESTABILIDAD IN VIVO MEJORADA

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una proteína secretada que fue descubierta hace 50 años como una molécula que promueve la supervivencia y diferenciación de las neuronas sensoriales y simpatéticas. La cadena beta del NFG solamente es responsable de la actividad estimulante del crecimiento nervioso del NGF. La cadena beta se homodimeriza y se incorpora en un complejo de proteína grande. NGF es un miembro de una familia de factores neurotróficos conocida como neurotrofinas. El NGF enlaza con alta afinidad a un receptor de tropomiosina cinasa conocido como TrkA. El NGF también es capaz de enlazar un receptor conocido como $p75^{NTR}$, un miembro de la superfamilia del receptor de factor de necrosis de tumor, el cual también interactúa con otras neurotrofinas. La estructura y función del NGF es revisada en, por ejemplo, Sofroniew, M. V. *et al.* (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* 24:1217-1281; Weismann, C. and de Vos, A.M. (2001) *Cell. Mol. Life Sci.* 58:748-759; Fahnestock, M. (1991) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 165:1-26.

Aunque el NGF fue originalmente identificado por su capacidad de promover la supervivencia y diferenciación de neuronas, hay creciente evidencia que estos efectos de

desarrollo solamente son un aspecto de la biología del NGF. En particular, el NGF se ha implicado en la transmisión y mantenimiento de dolor persistente o crónico. Por ejemplo, se ha mostrado que la administración tanto local como sistémica del NGF produce hiperalgesia y alodinia (Lewin, G.R. *et al.* (1994) *Eur. J. Neurosci.* 6:1903-1912). La infusión intravenosa del NGF en humanos produce una mialgia de cuerpo completo mientras la administración evoca alodinia e hiperalgesia en el sitio de inyección además de los efectos sistémicos (Apfel, S.C. *et al.* (1998) *Neurology* 51:695-702). Además, en ciertas formas de cáncer, el exceso de NGF facilita el crecimiento e infiltración de las fibras nerviosas con inducción de color de cáncer (Zhu, Z. *et al.* (1999) *J. Clin. Oncol.* 17:241-228).

El involucramiento del NGF en dolor crónico ha conducido al interés considerable de procedimientos terapéuticos basados en la inhibición de efectos del NGF (ver *por ejemplo*, Saragovi, H.U. and Gehring, K. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.* 21:93-98). Por ejemplo, una forma soluble del receptor de TrkA fue utilizada para bloquear la actividad del NGF, lo cual se mostró que reduce significativamente la formación de neuronas, responsable del dolor neuropática, sin dañar los cuerpos celulares de las neuronas lesionadas (Kryger, G. S. *et al.* (2001) *J. Hand Surg.* (Am.) 26:635-644).

Otro procedimiento para neutralizar la actividad de

NGF es el uso de anticuerpos anti-NGF, se han descrito los ejemplos de los anticuerpos (ver *por ejemplo*, Publicaciones PCT Nos. WO 2001/78698, WO 2001/64247, WO 2002/096458, WO 2004/032870, WO 2005/061540, WO 2006/131951, WO 2006/110883, Patente de Estados Unidos No. 7,449,616; Publicaciones de Estados Unidos Nos. US 20050074821, US 20080033157, US 20080182978 y US 20090041717). En modelos animales de dolor neuropático (por ejemplo, ligación del nervio espinal o tronco nervioso) la inyección sistémica de anticuerpos neutralizantes al NGF previene tanto la alodinia como hiperalgesia (Ramer, M.S. and Bisby, M.A. (1999) *Eur. J. Neurosci.* 11:837-846; Ro, L.S. *et al.* (1999) *Pain* 79:265-274). Además, el tratamiento con un anticuerpo anti-NGF neutralizante produce reducción significativa de dolor en un modelo de dolor de cáncer murino (Sevcik, M.A. *et al.* (2005) *Pain* 115:128-141).

Por consiguiente, en vista de lo anterior, son deseables los antagonistas de NGF adicionales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Esta invención proporciona anticuerpos anti-NGF que exhiben estabilidad *in vivo* mejorada. En particular, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende una mutación,

preferiblemente una mutación de región bisagra, y en donde el anticuerpo exhibe una semivida de eliminación terminal inesperadamente larga, tal como una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de al menos 15 días y típicamente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 días (o un intervalo de 15 días a 22 días), o en un intervalo de aproximadamente 15 días a 28 días (o en un intervalo de 15 días a 28 días), o en el intervalo de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días (o en el intervalo de 21 días a 28 días). Este anticuerpo anti-NGF estabilizado (*por ejemplo*, anticuerpo de bisagra estabilizada) también exhibe una semivida de eliminación terminal en ratas de al menos 8 días, típicamente en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 9 días (o en el intervalo de 8 a 9 días). En todavía otras modalidades, el anticuerpo anti-NGF estabilizado (*por ejemplo*, anticuerpo de bisagra estabilizada) puede exhibir una semivida de eliminación terminal en humanos de al menos 10-30 días, o al menos 10 días, al menos 15 días, al menos 20 días, al menos 25 días, al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 10 a 40 días o en un intervalo de 15 a 30 días). En todavía otras modalidades, el anticuerpo anti-NGF estabilizado (*por ejemplo*, anticuerpo de bisagra

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

Preferiblemente, la mutación en la región constante de IgG4 es una mutación de región bisagra. Aún más preferiblemente, la mutación de región bisagra en la región constante de IgG4 comprende la mutación de la serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9 (la cual muestra la secuencia de aminoácido tipo silvestre de la región constante de IgG4 humana). Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que tiene una región constante de IgG4 humana, la región constante de IgG4 humana que contiene una mutación de región bisagra comprende la mutación de serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9. Más preferiblemente, la serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9 es mutada a prolina. En una modalidad preferida, la región constante de IgG4 humana del

anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 10. Alternativamente, otras posibles mutaciones estabilizantes de IgG4 se describen en la presente.

Un anticuerpo anti-NGF preferido de la invención es el anticuerpo PG110, la secuencia de aminoácido de cadena pesada la cual se muestra en la SEC ID NO: 13 y la secuencia de aminoácido de cadena ligera la cual se muestra en la SEC ID NO: 16. Por consiguiente, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 13 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 16. En otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada codificada por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 11 y una cadena ligera codificada por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 14. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 13, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de al menos 15 días (y típicamente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 días, o en un intervalo de 15 a 22 días, o en un intervalo de

aproximadamente 15 días a 28 días, o en un intervalo de 15 a 28 días, o en el intervalo de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días o en el intervalo de 21 a 28 días), y/o tiene una semivida de eliminación terminal en un humano de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días, o en un intervalo de 10 a 40 días o en el intervalo de 15 a 30 días). Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). Preferiblemente, la cadena pesada se codifica por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 11. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 16. Preferiblemente, la cadena ligera se codifica por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 14.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1 (la cual muestra la región variable de cadena pesada de PG110). En otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2 (la cual muestra la región variable de cadena ligera de PG110). En todavía otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2. En aún otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF compite por enlazar a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente (en donde las SEC ID NOs: 3, 4 y 5 muestran la región variable de cadena pesada CDRs 1, 2 y 3, respectivamente, de PG110). En otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8,

respectivamente (en donde las SEC ID NOs: 6, 7 y 8 muestran la región variable de cadena ligera CDRs 1, 2 y 3, respectivamente, de PG110). En aún otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, y comprende una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-NGF tiene una o más de las siguientes propiedades funcionales:

a) enlaza a NGF humano pero no enlaza al factor neurotrófico derivado de cerebro humano (BDNF), neurotrofina humana 3 (NT-3) o neurotrofina humana 4 (NT-4);

b) enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos;

c) inhibe el enlace de NGF a TrkA o $p75^{NTR}$;

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

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

f) inhibe la excrecencia de neurita de célula PC12 dependiente del NGF.

En otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF de la invención no exhibe un efecto de rebote cuando se administra a un sujeto. Por ejemplo, una cantidad de dosificación y frecuencia de dosificación de la administración del anticuerpo se pueden seleccionar de modo que el anticuerpo no exhiba un efecto de rebote cuando se administra a un sujeto.

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

En una modalidad particularmente preferida, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF que tiene las características ventajosas combinadas de una semivida de

eliminación terminal extendida y una duración prolongada de alivio de dolor. Por consiguiente, la invención también proporciona un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende una mutación (preferiblemente una mutación de región bisagra), en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un humano de al menos 10-30 días, o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 10-40 días o en un intervalo de 15-30 días), y en donde el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente una semana a aproximadamente doce semanas, o al menos una semana a doce semanas, o al menos aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas, o al menos cuatro semanas a doce semanas, después de la administración de una dosis única del anticuerpo a un sujeto humano (o al menos una semana, o al menos dos semanas, o al menos cuatro semanas, o al menos ocho semanas, o al menos doce semanas, o una a doce semanas, o cuatro a doce semanas, u ocho a doce semanas, después de la administración de una dosis única del anticuerpo a un sujeto humano). Preferiblemente, la mutación de región bisagra comprende la mutación de la serina en la posición de

aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9, preferiblemente una mutación de serina a prolina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9. Más preferiblemente, la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10. En varias modalidades, el anticuerpo puede exhibir una o más de las propiedades funcionales descritas en la presente. En una modalidad preferida, el anticuerpo compite por el enlace a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, y en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $p75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos. Preferiblemente, el anticuerpo tiene semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días, o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos

25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 10-40 días o en un intervalo de 15-30 días). Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). El anticuerpo adicionalmente puede exhibir una o más propiedades funcionales adicionales, tal como enlace del NGF humano pero no enlace del factor neurotrófico derivado de cerebro humano (BDNF), neurotrofina humana 3 (NT-3) o neurotrofina humana 4 (NT-4); inhibición de la supervivencia de ganglio de raíz dorsal de pollo dependiente del NGF; y/o inhibición de excrecencia de neurita de célula PC12 dependiente del NGF. Preferiblemente, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente una semana a aproximadamente doce semanas, o al menos aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas, o al menos aproximadamente ocho semanas a aproximadamente doce semanas, o al menos una semana a doce semanas, o al menos cuatro

semanas a doce semanas o al menos ocho semanas a doce semanas (o al menos una semana, o al menos cuatro semanas, o al menos ocho semanas, o al menos doce semanas, o por una a doce semanas, o por cuatro a doce semanas, o por ocho a doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, o el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, o el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 o el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, o el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia

de aminoácido de la SEC ID NO: 2, o el anticuerpo compite por enlazar al NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

En varias modalidades preferidas, la invención proporciona anticuerpos anti-NGF que tienen las siguientes características:

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al

menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs

1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un

intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1,

(ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $P75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos, y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al

menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $P75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una

región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $P75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $P75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una

región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $P75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $P75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante que

comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $P75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende una mutación, y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de al menos 15 días. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos

40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

En varias modalidades, el anticuerpo anti-NGF de la invención puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o humano, o un anticuerpo en el cual se han eliminado los epítopes de célula T potenciales.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-NGF de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un método para atenuar o inhibir una enfermedad o afección relacionada con NGF en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-NGF de la invención. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y afecciones relacionadas con NGF incluyen dolor inflamatorio, dolor post-operatorio, dolor neuropático, dolor por fractura, dolor por articulación con gota, neuralgia post-herpética, dolor por cáncer, dolor por osteoartritis o artritis reumatoide, ciática, dolores asociados con crisis de células falciformes, cefaleas, dismenorrea, endometriosis, dolor musculoesquelético, dolor crónico de espalda baja,

fibromialgia, esguinces, dolor visceral, quistes de ovarios, prostatitis, cistitis, cistitis intersticial, dolor por incisión, migraña, neuralgia trigeminal, dolor por quemaduras y/o heridas, dolor asociado con trauma, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor de metástasis de hueso, dolor de VIH, eritromelalgia o dolor causado por pancreatitis o piedras en el riñón. Otros ejemplos de enfermedades y afecciones relacionadas con NGF incluyen melanoma maligno, síndrome de Sjogren y asma, tal como asma no controlado con hipersensibilidad severa de vías respiratorias, y tos intratable. Las enfermedades y afecciones particularmente preferidas para tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención incluyen dolor inflamatorio (preferiblemente dolor por osteoartritis o artritis reumatoide), dolor musculoesquelético (particularmente dolor crónico de espalda baja), dolor neuropático (particularmente neuropatía diabética), dolor por cáncer y dolor de metástasis de hueso, cistitis intersticial/síndrome de vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis y/o fibroides uterino y dolor post-operatorio.

El anticuerpo se puede administrar, por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente (*por ejemplo*, vía una pluma de inyección o implante subcutáneo), intramuscularmente o

intra-articularmente, aunque otras rutas de administración adecuadas se describen en la presente. Preferiblemente, el anticuerpo se administra a una dosis en un intervalo de 0.1 mg/kg a 3 mg/kg o a una dosis en un intervalo de 0.1 mg/kg a 30 mg/kg. El anticuerpo se puede administrar, por ejemplo, a una dosis en un intervalo desde aproximadamente 3 µg/kg a aproximadamente 3000 µg/kg, con dosificaciones preferidas incluyendo 100 µg/kg o 300 µg/kg. En otras modalidades, el anticuerpo se administra a una dosis en un intervalo de 0.1 mg/kg a 30 mg/kg, o en un intervalo de 0.1 mg/kg a 20 mg/kg, o en un intervalo de 0.1 mg/kg a 10 mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 30 mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 20 mg/kg o en un intervalo de 1 mg/kg a 10 mg/kg, aunque otras dosificaciones e intervalos de dosis adecuados se describen en la presente. Además, se puede usar una formulación de dosis fija del anticuerpo.

El anticuerpo se puede administrar solo o en combinación con uno o más agentes farmacéuticos adicionales. Por ejemplo, un segundo agente farmacéutico, tal como un agente NSAID, un analgésico (*por ejemplo*, un analgésico opioide), un anestésico local, un bloqueo de nervios, un bloqueo de fenol, un anticuerpo terapéutico, un anti-convulsivo, un anti-depresivo, capsaicina tópica, un estereoide o un antiviral, se puede administrar en combinación con el anticuerpo anti-NGF de la invención. Los

segundos agentes farmacéuticos particularmente preferidos para el tratamiento de combinación con un anticuerpo de la invención incluyen analgésicos opioides, tal como morfina y similares. Otros segundos agentes farmacéuticos preferidos para el tratamiento de combinación incluyen inhibidores de TrkA e inhibidores de Proteína Cinasa C (PKC).

En una modalidad preferida, la invención proporciona un método para atenuar o inhibir el dolor en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, y en donde el anticuerpo alivia el dolor en el sujeto por una duración de al menos cuatro a doce semanas (o por al menos una a doce semanas, o por al menos ocho a doce semanas, o por cuatro a doce semanas, o por una a doce semanas, o por ocho a doce semanas, o por al menos una semana, o por al menos cuatro semanas, o por al menos ocho semanas, o por al menos doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que

comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2. Preferiblemente, el dolor se selecciona del grupo que consiste de dolor por osteoartritis, dolor crónico de espalda baja, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor de metástasis de hueso, cistitis intersticial, síndrome de vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con fibroides uterinos y dolor post-operatorio. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NGF se administra a una dosis en un intervalo desde 0.1 a 3 mg/kg o a una dosis en un intervalo desde 0.1 mg/kg a 30 mg/kg. Preferiblemente, el anticuerpo se administra intravenosamente o subcutáneamente. Preferiblemente, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un humano de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días, o en un intervalo de 10 a 40 días o en el intervalo de 15 a 30 días).

En otra modalidad preferida, la invención proporciona un método para atenuar o inhibir una enfermedad o afección relacionada con el factor de crecimiento nervioso (NGF) en un sujeto de modo que se evita un efecto de rebote en el sujeto, el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende una mutación de región bisagra, y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un humano de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días, o en un intervalo de 10 a 40 días o en el intervalo de 15 a 30 días), y en donde el anticuerpo se administra a una dosificación y a una frecuencia de modo que se evita un efecto de rebote en el sujeto. Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas).

Preferiblemente, la región constante de IgG4 humana comprende una mutación en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9. Preferiblemente, la serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9 es mutada a prolina. Preferiblemente, la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2. Preferiblemente, el anticuerpo compite por enlazar al NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2. Preferiblemente, la enfermedad o afección relacionada con NGF es dolor seleccionado del grupo que consiste de dolor por osteoartritis, dolor crónico

de espalda baja, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor de metástasis de hueso, cistitis intersticial, síndrome de vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con fibroides uterino y dolor post-operatorio. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NGF se administra a una dosis en un intervalo desde 0.1 a 3 mg/kg o en un intervalo desde 0.1 mg/kg a 30 mg/kg. Preferiblemente, el anticuerpo se administra intravenosamente o subcutáneamente.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso del anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para el uso para atenuar o inhibir una enfermedad o afección relacionada con NGF en un sujeto. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y afecciones relacionadas con NGF incluyen aquellos descritos anteriormente. Una enfermedad o afección relacionada con NGF preferida es dolor. Preferiblemente, el dolor se selecciona del grupo que consiste de dolor por osteoartritis, dolor crónico de espalda baja, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor de metástasis de hueso, cistitis intersticial, síndrome de vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con fibroides uterinos y dolor post-operatorio.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso

del anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para el uso para atenuar o inhibir el dolor en un sujeto, de modo que el dolor es atenuado o inhibido en el sujeto por una duración de al menos aproximadamente una semana a aproximadamente doce semanas, o al menos aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas, o al menos aproximadamente ocho semanas a aproximadamente doce semanas (o por una duración de una a doce semanas, o cuatro a doce semanas, u ocho a doce semanas, o al menos una semana, o al menos dos semanas, o al menos cuatro semanas, o al menos ocho semanas, o al menos doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso del anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para el uso para atenuar o inhibir una enfermedad o afección relacionada con NGF en un sujeto de modo que se evita el efecto de rebote en el sujeto. En particular, el anticuerpo se administra a una dosificación y a una frecuencia de modo que se evita un efecto de rebote en el sujeto.

En aún otros aspectos, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican las cadenas pesadas y/o cadenas ligeras de los anticuerpos anti-NGF de la invención, así como también vectores (*por ejemplo*, vectores

de expresión) que comprenden tales vectores, células huésped que comprenden tales vectores y métodos para expresar los anticuerpos anti-NGF usando las células huésped de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para atenuar o inhibir una enfermedad o afección relacionada con el factor de crecimiento nervioso (NGF) en un sujeto de modo que se evita el efecto de rebote en el sujeto. El método comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende una mutación (preferiblemente una mutación de región bisagra) y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de al menos 15 días, más preferiblemente de al menos 21 días, y en donde el anticuerpo se administra a una dosificación y a una frecuencia de modo que se evita el efecto de rebote en el sujeto. En otra modalidad, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 22 días (o 15-22 días), o un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 28 días (o 15-28 días), o en un intervalo de aproximadamente 21 día a aproximadamente 28 días (o 21-28 días). En otra modalidad, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en una rata de al menos 8 días. En todavía otra modalidad, el

anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días, o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días, o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días, o en un intervalo de 10-40 días o en un intervalo de 15-30 días). Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). Las mutaciones preferidas incluyen aquellas descritas anteriormente. Los anticuerpos preferidos incluyen aquellos que tienen las secuencias y/o las propiedades funcionales adicionales como se describen anteriormente. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y afecciones relacionadas con NGF incluyen aquellas descritas anteriormente.

La invención también proporciona el uso del anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para el uso para atenuar o inhibir una enfermedad o afección relacionada con NGF en un sujeto de modo que se

evita un efecto de rebote en el sujeto.

Los kits que comprenden un anticuerpo anti-NGF de la invención también se proporcionan en la presente. Por ejemplo, un kit puede comprender el anticuerpo anti-NGF e instrucciones de uso del anticuerpo en el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con NGF.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una gráfica que muestra el enlace de PG110 al factor de crecimiento nervioso humano (NGF) pero no al factor neurotrófico derivado de cerebro humano (BDNF), neurotrofina humana 3 (NT-3) o neurotrofina humana 4 (NT-4), como se determina por ELISA.

La Figura 2A es una gráfica que muestra la inhibición del enlace de NGF al receptor de TrkA por el anticuerpo PG110, como se determina por un experimento de enlace de ligando radioetiquetado.

La Figura 2B es una gráfica que muestra la inhibición del enlace de NGF al receptor de $p75^{NTR}$ por el anticuerpo PG110, como se determina por un experimento de enlace de ligando radioetiquetado.

La Figura 3A es una gráfica que muestra el efecto inhibitorio del anticuerpo PG110 en la proliferación de células TF-1 estimulada por el NGF humano.

La Figura 3B es una gráfica que muestra el efecto

inhibitorio del anticuerpo PG110 en la proliferación de células TF-1 estimulada por el NGF de rata.

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

La Figura 4 es una gráfica que muestra el efecto del tratamiento con anticuerpo PG110 en la piel lesionada en ratas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención pertenece a anticuerpos anti-factor de crecimiento nervioso que exhiben estabilidad *in vivo* mejorada, como es evidenciado, por ejemplo, por una semivida de eliminación terminal inesperadamente larga en monos cynomolgus. Los anticuerpos de la invención incluyen una modificación de la región constante de IgG4 humana del anticuerpo, por introducción de una mutación en la región constante de IgG4, preferiblemente en la región bisagra de la región constante.

Para que la presente invención pueda ser más fácilmente entendida, primero se definen ciertos términos. Las definiciones adicionales se describen en toda la descripción detallada.

I. Definiciones

Los términos "factor de crecimiento nervioso" o "NGF" se usan intercambiablemente en la presente e incluyen variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, un anticuerpo específico para NGF humano, en ciertos casos, puede reaccionar cruzado con NGF de especies diferentes de la humana. En otras modalidades, un anticuerpo específico para NGF humano puede ser completamente específico para NGF humano y no puede exhibir especies u otros tipos de reactividad cruzada. El término "NGF humano" se refiere a NGF

de secuencia humana, de modo que comprende la secuencia de aminoácido de cadena de NGF-β humano, la forma precursora del cual tiene el número de acceso de Genbank NP_002497, codificado por la secuencia de nucleótido de número de acceso de Genbank NM_002506. La secuencia de cadena de NGF-β humano puede diferir del NGF-β humano de No. de Acceso de Genbank NP_002497 por tener, por ejemplo, sustituciones conservadas o sustituciones en regiones no conservadas en donde el NGF-β humano sustancialmente tiene la misma función biológica como el NGF-β humano de No. de Acceso de Genbank NP_002497. El término "NGF de rata" se refiere al NGF de secuencia de rata, de modo que comprende la secuencia de aminoácido de cadena de NGF-β de rata, la forma precursora del cual tiene el número de acceso de Genbank XP_227525, codificado por la secuencia de nucleótido de número de acceso de Genbank XP_227525. El término "NGF de ratón" se refiere al NGF de secuencia de rata, de modo que comprende la secuencia de aminoácido de cadena de NGF-β de ratón, la forma precursora del cual tiene número de acceso de Genbank NP_038637, codificado por la secuencia de nucleótido de número de acceso de Genbank NM_013609.

El término "receptor de TrkA", como se usa en la presente, se refiere a un receptor de NGF también conocido en el arte como receptor A de tropomiosina cinasa y receptor de tirosina cinasa neurotrófica tipo 1 (NTRK1). Las secuencias

no limitantes ejemplares de receptor de TrkA humana incluyen las secuencias de aminoácido de número de acceso de Genbank NP_001012331 (isoforma 1), NP_002520 (isoforma 2) y NP_001007793 (isoforma 3).

El término "receptor de $p75^{NTR}$", como se usa en la presente se refiere a un receptor de neurotrofina, con un peso molecular de aproximadamente 75 kDa, que enlaza el NGF y otras neurotrofinas, el receptor se describe en, *por ejemplo*, Bothwell, M. (1996) *Science* 272:506-507. Una secuencia no limitante ejemplar para el receptor de $p75^{NTR}$ humano es la secuencia de aminoácido de número de acceso de Genbank NP_002498, codificado por la secuencia de nucleótido de número de acceso de Genbank NM_002507.

El término "semivida de eliminación terminal", como se usa en la presente con respecto a los anticuerpos anti-NGF, se refiere a la cantidad de tiempo necesaria para que la concentración del anticuerpo, como se mide en el suero de un sujeto al cual el anticuerpo se ha administrado, sea reducida a la mitad una vez que tanto la absorción como redistribución del anticuerpo se completan. Cuando se usa un grupo de sujetos, la media geométrica de la semivida de eliminación terminal en los sujetos se puede usar como la medida de la semivida de eliminación terminal del anticuerpo.

El término "semivida farmacológica", como se usa en la presente con respecto a los anticuerpos anti-NGF, se

refiere a la cantidad promedio de tiempo para mantener el efecto del fármaco *in vivo* (MRT para efecto del fármaco). Se puede calcular como la relación de área de la curva de efecto-tiempo de valor basal corregido de primer momento (AUMEC) vs. efecto del fármaco con el tiempo de valor basal corregido acumulado (área bajo la curva de efecto-tiempo, AUEC), usando la siguiente fórmula:

$$\text{Semivida Farmacológica} = \frac{\text{AUMEC}}{\text{AUEC}} = \frac{\int E(t)\,t\,dt}{\int E(t)\,dt}$$

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

El término "mutación de región bisagra", como se usa en la presente, se refiere a una mutación, tal como una mutación de punto, sustitución, adición o supresión, en la región bisagra de un dominio constante de inmunoglobulina.

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

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina", como se usa intercambiablemente en la presente, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de enlace de antígeno (*es decir*, "porción de enlace de antígeno") o cadenas únicas del mismo que retienen la estabilidad *in vivo* mejorada descrita en la presente. Un "anticuerpo" comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) inter-conectadas por enlaces de disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está comprendida de una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, llamadas regiones de armazón (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, arregladas de amino-término a carboxi-término en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de

los anticuerpos pueden mediar el enlace de la inmunoglobulina a los tejidos huéspedes o factores, incluyendo varias células del sistema inmunitario (*por ejemplo,* células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir,* los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para mutaciones que posiblemente se presentan naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, se dirigen contra un sitio antigénico único. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) las cuales típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando cualquier técnica reconocida en el arte, por ejemplo, un método de hibridoma, como se describe por Kohler *et al.* (1975) *Nature,* 256:495, un animal transgénico, como se describe por, por ejemplo, (ver *por ejemplo,* Lonberg, *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859), métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 4,816,567), o usando bibliotecas de anticuerpos de fagos

usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clarkson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al*, *J. Mol. Biol*, 222:581-597 (1991). Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados y pueden presentarse naturalmente o producirse recombinantemente.

El término "anticuerpo recombinante", se refiere a los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medio recombinante, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (*por ejemplo*, un ratón) que es transgénico o transcromosomal para genes de inmunoglobulina (*por ejemplo*, genes de inmunoglobulina humana) o un hibridoma preparado de estos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, *por ejemplo*, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpo combinatorial, recombinante (*por ejemplo*, que contiene secuencias de anticuerpo humano) usando expresión en fagos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que involucra empalme de secuencias de gen de inmunoglobulina (*por ejemplo*, genes de inmunoglobulina humana) a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos recombinantes pueden tener regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a

mutagénesis *in vivo* y por consiguiente las secuencias de aminoácido de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, mientras se derivan de y relacionan con las secuencias de V_H y V_L de línea germinal humana, no pueden existir naturalmente dentro del reportero de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

El término anticuerpo o "inmunoglobulina quimérica" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables se derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes se derivan de una segunda especie. Los anticuerpos o inmunoglobulinas quiméricas se pueden construir, por ejemplo por ingeniería genética, a partir de segmentos de gen de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies.

El término "anticuerpo humanizado" o "inmunoglobulina humanizada" se refiere a un anticuerpo o inmunoglobulina que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizado (*es decir*, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). El término "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizado" (*es decir*, una "cadena ligera de inmunoglobulina humanizada" o "cadena pesada de inmunoglobulina humanizada") se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (*es decir*, una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región de armazón variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo

humano y regiones determinantes de complementariedad (CDRs) (*por ejemplo*, al menos una CDR, preferiblemente dos CDRs, más preferiblemente tres CDRs) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano, y adicionalmente incluye regiones constantes (*por ejemplo*, al menos una región constante o porción de la misma, en el caso de una cadena ligera, y preferiblemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). El término "región variable humanizada" (*por ejemplo*, "región variable de cadena ligera humanizada" o "región variable de cadena pesada humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región de armazón variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDRs) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.

El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, se propone que incluya anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales las regiones tanto de armazón como CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana como se describe, por ejemplo, por Kabat *et al.* (*Ver* Kabat, *et al.* (1991) *Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de

inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (*por ejemplo,* mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o de sitio específico *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, no se propone que incluya anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias de armazón humanas.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente, se propone que se refiera a un anticuerpo el cual está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (*por ejemplo,* un anticuerpo aislado que específicamente enlaza a NGF está sustancialmente libre de anticuerpos que específicamente enlazan antígenos diferentes de NGF). Además, un anticuerpo aislado típicamente está sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos.

Como se usa en la presente, los términos "enlace específico", "específicamente enlaza", "enlace selectivo", y "selectivamente enlaza", significan que un anticuerpo o porción de enlace de antígeno del mismo, exhibe afinidad apreciable para un antígeno o epítope particular y,

generalmente, no exhibe reactividad cruzada significativa con otros antígenos o epítopes. "Apreciable" o enlace preferido incluye el enlace con una afinidad de al menos 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 M^{-1}, o 10^{10} M^{-1}. Las afinidades mayores de 10^7 M^{-1}, preferiblemente mayores de 10^8 M^{-1} son más preferidas. Los valores intermedios de aquellos descritos en la presente también se proponen para estar dentro del alcance de la presente invención y una afinidad de enlace preferida se puede indicar como un intervalo de afinidades, por ejemplo, 10^6 a 10^{10} M^{-1}, preferiblemente 10^7 a 10^{10} M^{-1}, más preferiblemente 10^8 a 10^{10} M^{-1}. Un anticuerpo que "no exhibe reactividad cruzada significativa" es uno que apreciablemente no enlazará a una entidad indeseable (*por ejemplo*, una entidad proteinácea indeseable). El enlace específico o selectivo se puede determinar de acuerdo con cualquier medio reconocido en el arte para determinar tal enlace, incluyendo, por ejemplo, de acuerdo con el análisis de Scatchard y/o ensayos de enlace competitivo.

El término "K_D" como se usa en la presente, se propone para referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular o la afinidad de un anticuerpo para un antígeno. En una modalidad, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención enlaza un antígeno (*por ejemplo*, NGF) con una afinidad (K_D) de aproximadamente 100 pM o menos (*es decir*, o mejor) (*por*

ejemplo, aproximadamente 90 pM o aproximadamente 80 pM o aproximadamente 70 pM o aproximadamente 60 pM o aproximadamente 50 pM o aproximadamente 40 pM o aproximadamente 30 pM), como se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón de superficie o un ensayo de enlace de células. En una modalidad preferida, el anticuerpo enlaza el NGF con una afinidad (K_D) en un intervalo de aproximadamente 25-35 pM.

El término "K_{ass}", como se usa en la presente, se propone para referirse a la constante de velocidad de asociación para la asociación de un anticuerpo en el complejo de anticuerpo/antígeno.

El término "K_{diss}", como se usa en la presente, se propone para referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno.

El término "IC_{50}", como se usa en la presente, se refiere a la concentración de un anticuerpo que inhibe una respuesta, ya sea en un ensayo *in vitro* o *in vivo*, a un nivel que es 50% de la respuesta inhibitoria máxima, *es decir*, la mitad entre la respuesta inhibitoria máxima y la respuesta sin tratar.

El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en la presente se propone que incluye moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser

ADN de cadena única o doble cadena, pero preferiblemente es de doble cadena. El término "molécula de ácido nucleico aislada", como se usa en la presente con referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpo (*por ejemplo*, V_H, V_L, CDR3) que enlazan a NGF, se propone para referirse a una molécula de ácido nucleico en la cual las secuencias de nucleótido que codifican el anticuerpo o porción de anticuerpo están libres de otras secuencias de nucleótido que codifican anticuerpos que enlazan antígenos diferentes de NGF, las otras secuencias pueden flanquear naturalmente el ácido nucleico en ADN genómico humano.

El término "operativamente enlazado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico colocada en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia señal o secuencia líder secretora es operativamente enlazado a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o mejorador es operativamente enlazado a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de enlace de ribosoma es operativamente enlazado a una secuencia codificante si se posiciona para facilitar la traducción. Generalmente, "operativamente enlazado" significa que las secuencias de ADN que se enlazan son contiguas, y, en el caso de líder secretora, contigua y en fase de lectura. Sin

embargo, los mejoradores no tienen que ser contiguos. El enlace se realiza por ligación en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los enlazantes o adaptadores de oligonucleótido sintéticos se usan de conformidad con la práctica convencional. Un ácido nucleico es "operativamente enlazado" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o mejorador es operativamente enlazado a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia. Con respecto a la secuencias regulatorias de transcripción, operativamente enlazado significa que las secuencias de ADN que se enlazan son contiguas y, donde sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en cuadro de lectura. Para secuencias de cambio, operativamente enlazado indica que las secuencias son capaces de efectuar la recombinación de cambio.

El término "vector", como se usa en la presente, se propone para referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle de ADN de cadena doble circular en el cual los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula

huésped en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episomal). Otros vectores (*por ejemplo*, vectores de mamífero no episomal) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped en la introducción en la célula huésped, y se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales se enlazan operativamente. Tales vectores son referidos en la presente como "vectores de expresión recombinante" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en la forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" se pueden usar intercambiablemente. Sin embargo, la invención se propone que incluya otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (*por ejemplo*, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), los cuales sirven como funciones equivalentes.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en la presente, se propone para referirse a una célula en la cual un vector de expresión recombinante se ha introducido. Se deberá entender que tales términos se proponen para referirse no solamente a la célula objeto particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en

generaciones subsiguientes debido a influencias ya sea de mutación o ambientales, tal progenie no puede, en efecto, ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluyen dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en la presente.

Los términos "tratar", "tratando", y "tratamiento", como se usan en la presente, se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en la presente. Los métodos de "tratamiento" emplean la administración, a un sujeto, de un anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, un sujeto que tiene una enfermedad o afección relacionada con NGF, para prevenir, curar, retardar, reducir la severidad de, o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad o afección.

El término "enfermedad o afección relacionada con NGF", como se usa en la presente, se refiere a enfermedades y afecciones en las cuales la actividad de NGF está involucrada con, o asociada con, o media o promueve uno o más síntomas de la enfermedad o afección.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier humano o animal no humano. En una modalidad particular, el sujeto es un humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, *por ejemplo*, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, oveja, perro, vaca, pollos, anfibios, reptiles, *etc.*

Como se usa en la presente, el término "efecto de rebote" se refiere a la eficacia disminuida de los agentes secuestrantes de NGF, tal como un anticuerpo anti-NGF, que se presenta en un sujeto después de un período inicial de efectividad después de la administración única o repetida. Por ejemplo, el tratamiento con un anticuerpo anti-NGF inicialmente puede aliviar el dolor, *por ejemplo*, debido a la inflamación o daño del nervio u otra etiología, que luego es seguido por un período de eficacia analgésica disminuida en la cual el dolor a la larga llega a ser tan intensa o más intensa que antes del tratamiento. En otro ejemplo, un anticuerpo anti-NGF puede exhibir una efectividad inicial en un sujeto por un período de tiempo después de la administración única o repetida, tal como un período de una semana después de la administración (*por ejemplo*, días 1-7 después de la administración), que luego es seguido por un período de eficacia disminuida, tal como por un período desde 1-2 semanas después de la administración (*por ejemplo*, días 7-14 después de la administración). Este período de "rebote" se puede seguir por un período de recuperación de eficacia del anticuerpo anti-NGF. Por ejemplo, puede existir un perfil bifásico de analgesia después de la administración única o repetida de un anticuerpo anti-NGF, con un período intermedio de eficacia reducida o sensación de dolor aún exagerada. Este efecto de rebote se puede valorar, por ejemplo, en estudios

clínicos de dolor, modelos experimentales de dolor y/u otros modelos de eficacia anti-NGF. Este efecto de rebote se puede asociar con, por ejemplo, dolor incrementado en el sujeto y/o eventos adversos incrementados (tales como sensaciones anormales, que varían desde alodinia a disestesia, parestesia e hiper- o hipoestesia) durante el período de rebote. Aunque no se pretende que sea limitado por el mecanismo, el efecto de rebote puede ser causado por la expresión alterada de NGF, expresión alterada del receptor de TrkA o p75 o señalización o cualquier otro mecanismo que resulta en eficacia disminuida temporal después de la administración única o repetida de un anti-NGF después de un período inicial de eficacia.

Varios aspectos de la invención se describen con detalle adicional en las siguientes subsecciones.

II. Anticuerpos de la Invención

A. Estabilidad *In Vivo* Mejorada

Los anticuerpos anti-NGF de la invención se caracterizan por tener estabilidad *in vivo* mejorada, como es evidenciado por la semivida de eliminación terminal larga observada *in vivo*. Aunque no se propone que sea limitado por el mecanismo, se piensa que la semivida de eliminación terminal extendida del anticuerpo resulta de una velocidad de depuración reducida del anticuerpo más rápida que de un incremento del volumen de distribución del anticuerpo. Los

anticuerpos de la invención comprenden una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación. Una mutación preferida es una mutación de región bisagra. Preferiblemente, la mutación de región bisagra comprende la mutación de serina en la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9 (en donde la SEC ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácido de la región constante de IgG4 humana tipo silvestre). Más preferiblemente, la mutación de región bisagra comprende la mutación de la serina en la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9 a prolina. En una modalidad preferida, la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10.

Un anticuerpo anti-NGF de la invención exhibe una semivida de eliminación terminal inesperadamente larga, tal como una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de al menos 15 días y típicamente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 días (o en un intervalo de 15-22 días), o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 15-28 días) o en un intervalo de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 21-28 días). Este anticuerpo anti-NGF estabilizado también exhibe una semivida de eliminación terminal en ratas de al menos 8 días, típicamente en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 9 días (o en un intervalo de 8-9 días). Como

se describe con detalle en el Ejemplo 4, PG110, un anticuerpo anti-NGF de la invención, exhibe una semivida de eliminación terminal media en monos cynomolgus de al menos 15 días y típicamente más larga. Por ejemplo, en un estudio de mono cynomolgus, se observó una semivida de eliminación terminal media en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 días. Además, el PG110 exhibe una semivida de eliminación terminal media en ratas de aproximadamente 8 a aproximadamente 9 días. Aún adicionalmente, como se conoce en el arte que la semivida de eliminación terminal de IgG en humanos es aproximadamente dos veces que la de los monos, se predijo que los anticuerpos anti-NGF de la invención, tal como PG110, tendrán semivida de eliminación terminal en humanos de al menos 10-30 días, o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o más preferiblemente al menos 30 días o al menos 40 días, o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días (o en un intervalo de 10-40 días) o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 15-30 días). Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un

intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). Como se describe adicionalmente en el Ejemplo 8, se ha mostrado que un anticuerpo anti-NGF de la invención tiene una semivida farmacológica media en humanos en los intervalos mencionados antes.

La semivida de eliminación terminal para PG110 en monos cynomolgus es considerablemente más larga que la semivida que se ha reportado en el arte para otros anticuerpos de IgG4 en monos cynomolgus. Por ejemplo, una semivida de aproximadamente 40-90 horas (aproximadamente 1.6-3.8 días) en monos cynomolgus se ha reportado para CDP571, un anticuerpo anti-TNF de IgG4 (*ver* Stephens, S. *et al.* (1995) *Immunol.* 85:668-674). De manera similar, una semivida de aproximadamente 3 días en monos cynomolgus se ha reportado para natalizumab, un anticuerpo anti-integrina de IgG4 (*ver* Refusal CHMP Assessment Report for Natalizumab, European Medicines Agency, London, 15 November 2007, Doc. Ref. EMEA/CHMP/8203/2008).

Una mutación de región bisagra preferida usada en la invención es una mutación de serina a prolina en la posición 108 en la SEC ID NO: 9. Esta mutación previamente se ha descrito en el arte (*ver* Angal, S. *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-108) y reportado que ha abolido la heterogeneidad de las moléculas de IgG4, en particular la

formación de medios anticuerpos que contienen una cadena pesada única y una cadena ligera única. Por consiguiente, la sustitución de un aminoácido diferente de prolina en la posición 108 de la SEC ID NO: 9 también es abarcada por la invención, en donde la sustitución logra el mismo efecto como la mutación de Ser a Pro en la eliminación de la heterogeneidad de la molécula de IgG4 (*por ejemplo*, la formación de medios anticuerpos). La capacidad de una mutación en la posición 108 para eliminar la heterogeneidad de la molécula de IgG4 se puede valorar como se describe en Angal *et al.* (1993), *supra*.

Además de, o alternativo a, la modificación en la posición 108 de la SEC ID NO: 9, se ha descrito que otras mutaciones de región bisagra de IgG mejoran la afinidad de la interacción de FcRn-IgG, resultando en una semivida extendida para la IgG modificada. Los ejemplos de tales modificaciones adicionales o alternativas incluyen mutaciones en uno o más residuos de región constante de IgG correspondientes a: Thr250, Met252, Ser254, Thr256, Thr307, Glu308, Met428, His433 y/o Asn434 (como se describe adicionalmente en Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604; Petkova, S.B. *et al.* (2006) *Int. Immunol.* 18:1759-1769; Hinton, P.R. *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279:6213-6216; Kamei, D.T. *et al.* (2005) *Biotechnol. Bioeng.* 92:748-760; Vaccaro, C. *et al.* (2005) *Nature Biotechnol.* 23:1283-1288;

Hinton, P.R. *et al.* (2006) *J. Immunol.* 176:346-356).

Aún adicionalmente, alternativo a las mutaciones de región bisagra, se han descrito otras modificaciones estabilizantes de la región constante de IgG4. Por ejemplo, en otras modalidades, la mutación de la región constante de IgG4 humana comprende la sustitución de la región CH3 de IgG4 con una región CH3 de IgG1, la sustitución de las regiones CH2 y CH3 de IgG4 con las regiones CH2 y CH3 de IgG1 o sustitución de la arginina en la posición 409 de la región constante de IgG4 (de acuerdo con la numeración Kabat) con una lisina, como se describe adicionalmente en la Publicación de Patente de Estados Unidos 20080063635. En todavía otras modalidades, la mutación de la región constante de IgG4 humana comprende la sustitución de Arg409, Phe405 o Lys370 (de acuerdo con la numeración Kabat), tal como la sustitución de Arg409 con Lys, Ala, Thr, Met o Leu, o la sustitución de Phe045 con Ala, Val, Gly o Leu, como se describe adicionalmente en la Publicación PCT WO 2008/145142.

Una mutación deseada se puede introducir en el dominio de región constante de IgG4 humana usando las técnicas estándares de ADN recombinante, tal como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR de un ácido nucleico que codifica la región constante de IgG4 humana. Además, el ADN que codifica una región variable de cadena pesada de anticuerpo se puede introducir en un vector de

expresión que codifica una región constante de IgG4 humana mutada de modo que la región variable y región constante llegan a ser operativamente enlazadas, para crear el vector que codifica una cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa en la cual la región constante es una región constante de IgG4 humana mutada. El vector de expresión luego se puede usar para expresar la cadena pesada de inmunoglobulina de longitud completa usando métodos estándares de expresión de proteína recombinante. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF de la invención se puede construir como se describe con detalle adicional en el Ejemplo 1.

La vida media de eliminación terminal de un anticuerpo se puede determinar usando métodos estándares en el arte. Por ejemplo, después de la administración del anticuerpo a un sujeto (*por ejemplo*, un mono cynomolgus, una rata Sprague-Dawley), las muestras de sangre se pueden obtener en varios puntos temporales después de la administración y la concentración del anticuerpo en el suero de las muestras de sangre se puede determinar usando una técnica conocida en el arte para determinar la concentración de anticuerpo (tal como un ensayo ELISA). El cálculo de la semivida terminal del anticuerpo se puede realizar usando métodos farmacocinéticos conocidos, por ejemplo usando un sistema de computadora y software diseñado para calcular los

parámetros farmacocinéticos (un ejemplo no limitante del cual es el SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System con software WinNonlin).

B. Regiones Variables de Anticuerpo

Las regiones variables de anticuerpo preferidas para el uso en el anticuerpo anti-NGF de la invención son las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo PG110. La región variable de cadena pesada de PG110 se muestra en la SEC ID NO: 1 y la región variable de cadena ligera de PG110 se muestra en la SEC ID NO: 2. Por consiguiente, en una modalidad, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1. En otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2. En todavía otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

La secuencia de aminoácido de longitud completa de la cadena pesada de PG110 (regiones variables y constantes) se muestra en la SEC ID NO: 13. Esta cadena pesada se puede

preparar de una cadena pesada precursora, la cual incluye una secuencia líder o señal, tal como la secuencia de aminoácido mostrada en la SEC ID NO: 12. La cadena pesada precursora de la SEC ID NO: 12 se codifica por la secuencia de nucleótido mostrada en la SEC ID NO: 11.

La secuencia de aminoácido de longitud completa de la cadena ligera de PG110 (regiones variables y constantes) se muestra en la SEC ID NO: 16. Esta cadena ligera se puede preparar de una cadena ligera precursora, la cual incluye una secuencia líder o señal, tal como la secuencia de aminoácido mostrada en la SEC ID NO: 15. La cadena ligera precursora de la SEC ID NO: 15 se codifica por la secuencia de nucleótido mostrada en la SEC ID NO: 14.

Por consiguiente, en otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 13, en donde el anticuerpo tiene una semivida en suero en un mono cynomolgus de al menos 15 días. En otra modalidad, la semivida en suero en un mono cynomolgus puede estar en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 22 días (o en un intervalo de 15-22 días). En otras modalidades, la semivida en suero en una rata puede ser al menos 8 días o en un intervalo de aproximadamente 8 días a aproximadamente 9 días (o en un intervalo de 8-9 días). En todavía otras modalidades, la semivida en suero en un humano puede ser al

menos 10-30 días, o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o al menos 40 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días (o en un intervalo de 10-40 días) o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 15-30 días). Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas) o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). Preferiblemente, la cadena pesada se codifica por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 11. Preferiblemente, la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 16. Preferiblemente, la cadena ligera se codifica por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 14.

En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 13 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 16.

En todavía otra modalidad, la invención proporciona

un anticuerpo anti-NGF que comprende la cadena pesada codificada por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 11, y una cadena ligera codificada por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 14.

Dado que la especificidad de enlace de PG110 se proporciona por las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) del dominio variable, en otra modalidad, un anticuerpo anti-NGF de la invención comprende las CDRs de la cadena pesada de PG110, la cadena ligera de PG110 o ambas. Las CDRs de cadena pesada 1, 2 y 3 de PG110 se muestran en las SEC ID NOs: 2, 4 y 5, respectivamente. Las CDRs de cadena ligera 1, 2 y 3 de PG110 se muestran en las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente. Por consiguiente, en una modalidad, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente. En otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente. En todavía otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, y comprende una región variable de cadena

ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente.

En todavía otra modalidad, un anticuerpo anti-NGF de la invención puede comprender regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácido que son homólogas a las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de PG110, y en donde los anticuerpos retienen la estabilidad *in vivo* mejorada exhibida por PG110. Por ejemplo, la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-NGF puede comprender una secuencia de aminoácido que es al menos 90% homóloga, más preferiblemente al menos 95% homóloga, más preferiblemente al menos 97% homóloga y aún más preferiblemente al menos 99% homóloga a la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1. La región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-NGF puede comprender una secuencia de aminoácido que es al menos 90% homóloga, más preferiblemente al menos 95% homóloga, más preferiblemente al menos 97% homóloga y aún más preferiblemente al menos 99% homóloga a la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

Como se usa en la presente, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácido es equivalente a la identidad de porcentaje entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por

las secuencias (*es decir*, % de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de aberturas, y la longitud de cada abertura, la cual necesita ser introducida para alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden realizar usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) el cual se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de abertura de 12 y una penalización de abertura de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácido se puede determinar usando el algoritmo de Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) el cual se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en http://www.gcg.com), usando ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de abertura de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

En todavía otra modalidad, un anticuerpo anti-NGF de la invención puede comprender regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden las secuencias de aminoácido de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de

PG110 pero en donde una o más sustituciones conservadoras se han introducido en las secuencias todavía el anticuerpo retiene la estabilidad *in vivo* mejorada exhibida por PG110. Por ejemplo, la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-NGF puede comprender una secuencia de aminoácido que es idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácido conservadoras en comparación con la SEC ID NO: 1. La región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-NGF puede comprender una secuencia de aminoácido que es idéntica a la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2 excepto por 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácido conservadoras en comparación con la SEC ID NO: 2.

Como se usa en la presente, el término "sustitución de aminoácido conservadora" se propone para referirse a modificaciones de aminoácido que no afectan o alteran significativamente las características de enlace o estabilidad del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácido. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácido. Las modificaciones se pueden introducir en un anticuerpo de esta descripción por técnicas estándares conocidas en el arte, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácido conservadoras son unas en las cuales el residuo aminoácido se

remplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han identificado en el arte. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*por ejemplo*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*por ejemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadenas laterales no polares (*por ejemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (*por ejemplo*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*por ejemplo*, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Por consiguiente, uno o más residuos aminoácido dentro de las regiones variables de PG110 se pueden remplazar con otros residuos aminoácido de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado se puede probar para la función retenida usando los ensayos funcionales descritos en la presente.

En todavía otra modalidad, un anticuerpo anti-NGF de la invención comprende regiones de enlace de antígeno (*es decir*, regiones variables) que enlazan al mismo epítope en NGF como el anticuerpo PG110 o que compiten cruzado para enlazar al NGF con PG110. Por consiguiente, en una modalidad, el anticuerpo anti-NGF de la invención compite por enlazar a

NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

Tales anticuerpos de competición cruzada se pueden identificar con base en su capacidad de competir cruzado con PG110 en ensayos estándares de enlace de NGF. Por ejemplo, se pueden usar ensayos ELISA estándares en los cuales una proteína de NGF recombinante (*por ejemplo*, NGF-β humano) se inmoviliza en la placa, uno de los anticuerpos se etiqueta fluorescentemente y se evalúa la capacidad de los anticuerpos no etiquetados para competir por el enlace del anticuerpo etiquetado. Adicionalmente o alternativamente, se puede usar el análisis BIAcore para valorar la capacidad de los anticuerpos para competir cruzado. Los ensayos de enlace adecuados que se pueden usar para probar la capacidad de un anticuerpo para competir para enlazar al NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2 se describen con detalle adicional en el Ejemplo 2.

En aún otras modalidades, un anticuerpo anti-NGF de la invención exhibe una o más propiedades funcionales del anticuerpo PG110. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF de la

invención puede exhibir una o más de las siguientes propiedades funcionales:

a) enlaza a NGF humano pero no enlaza al factor neurotrófico derivado de cerebro humano (BDNF), neurotrofina humana 3 (NT-3) o neurotrofina humana 4 (NT-4);

b) enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos;

c) inhibe el enlace de NGF a TrkA o $p75^{NTR}$;

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

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

f) inhibe la excrecencia de neurita de célula PC12 dependiente del NGF.

Estas propiedades funcionales se pueden valorar usando los ensayos *in vitro* descritos con detalle en los Ejemplos 2 y 3. Con respecto al enlace específico del anticuerpo al NGF humano, como se usa en la presente, el término "no enlaza al factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina humana 3 (NT-3) o neurotrofina humana 4 (NT-4)" se propone que signifique que la cantidad de enlace observada del anticuerpo al BDNF, NT-3 o NT-4, en un ensayo de enlace estándar (*por ejemplo*, ELISA, u otro ensayo *in vitro* adecuado como se describe en los Ejemplos) sea comparable con los

niveles antecedentes de enlace (*por ejemplo*, para un anticuerpo de control), por ejemplo no más de 2 veces arriba de los niveles antecedentes, o menos de 5% de enlace al BDNF, NT-3 o NT-4 en comparación con el enlace al NGF humano (en donde el nivel de enlace al NGF humano se establece como 100% de enlace).

En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10 (o en donde la región constante de IgG4 humana comprende una mutación de serina en la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9, preferiblemente una mutación de serina a prolina en la posición 108), y en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos (o, alternativamente, con una K_D de 300 pM o menos, 200 mP o menos, 150 pM o menos, 75 pM o menos o 50 pM o menos), inhibe el enlace de NGF a TrkA o $p75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos (o, alternativamente, con una IC_{50} de 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos o 200 pM o menos), e inhibe la proliferación dependiente de NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos (o, alternativamente, con una IC_{50} de 150 ng/ml o menos, 100 ng/ml o menos, 75 ng/ml o menos o 40 ng/ml

o menos). Preferiblemente, el anticuerpo tiene semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días, o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días (o en un intervalo de 10-40 días) o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 30 días (o en un intervalo de 15-30 días). Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 vías, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas (o en un intervalo de cuatro a seis semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas (o en un intervalo de cuatro a siete semanas), o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas (o en un intervalo de cuatro a ocho semanas). Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida de eliminación terminal media en un mono cynomolgus de al menos 15 días y típicamente en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 días (o en un intervalo de 15-22 días), o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 15-28 días) o en un intervalo de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 21-28 días). Adicionalmente o alternativamente, el anticuerpo puede exhibir una semivida de eliminación terminal en ratas de al

menos 8 días, típicamente en el intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 9 días (o en un intervalo de 8-9 días). El anticuerpo adicionalmente puede exhibir una o más propiedades funcionales adicionales, tal como enlace a NGF humano pero no enlace al factor neurotrófico derivado de cerebro humano (BDNF), neurotrofina humana 3 (NT-3) o neurotrofina humana 4 (NT-4); inhibición de la supervivencia de ganglio de raíz dorsal de pollo dependiente del NGF; y/o inhibición de excrecencia de neurita de célula PC12 dependiente del NGF. Preferiblemente, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente una semana a aproximadamente doce semanas después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, o el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, o el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente.

Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 o el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, o el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, o el anticuerpo compite por enlazar al NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

En todavía otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF de la invención no exhibe un efecto de rebote cuando se administra a un sujeto (*por ejemplo*, el anticuerpo se administra a una dosificación y a una frecuencia de modo que se evita un efecto de rebote en el sujeto). Un efecto de rebote, en el cual un anticuerpo anti-NGF exhibe eficacia disminuida en un sujeto después de un período inicial de efectividad después de la administración única o repetida, se ha reportado tanto en modelos animales como estudios clínicos de otros anticuerpos anti-NGF. Por ejemplo, tal efecto, referido como un "fenómeno de rebote", fue reportado por un anticuerpo anti-NGF de rata en un modelo de lesión de

constricción crónica (CCI) en ratas (Ro, L-S. *et al.* (1999) *Pain* 79:265-274). Adicionalmente, se han reportado estudios de dolor clínico con anticuerpo anti-NGF tanezumab (también conocido como RN624, E3, Registro CAS No. 880266-57-9) en los cuales un período de eventos adversos incrementados, tal como sensibilidad al tacto y una sensación de 'alfileres y agujas', se observó después de un período analgésico inicial (ver presentación por Hefti, Franz F., Rinat Neuroscience, LSUHSC, Shreveport, Louisiana, September 26, 2006). Aunque no se propone que sea limitado por mecanismo, se piensa que la semivida de eliminación terminal prolongada de los anticuerpos anti-NGF de la invención les permite evitar exhibir un efecto de rebote. Por consiguiente, otras ventajas de los anticuerpos anti-NGF de la invención incluyen una actividad más consistente y prolongada *in vivo* en comparación con otros anticuerpos anti-NGF del arte previo. Dada la semivida de eliminación terminal prolongada de los anticuerpos anti-NGF de la invención, se pueden usar dosificaciones menores (en comparación con otros anticuerpos anti-NGF), y el anticuerpo se puede usar a intervalos más frecuentes si es necesario, de modo que los regímenes de tratamiento de sincronización y dosificación se pueden elegir de modo que se evita un efecto de rebote en el sujeto.

En todavía otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF de la invención es capaz de aliviar el dolor por una larga

duración en un sujeto, por ejemplo el anticuerpo es capaz de aliviar el dolor por una duración de al menos aproximadamente una semana a aproximadamente doce semanas (o por una semana a doce semanas), después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En una modalidad, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente una semana (o al menos una semana) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra modalidad, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente dos semanas (o al menos dos semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra modalidad, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente cuatro semanas (o al menos cuatro semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra modalidad, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente ocho semanas (o al menos ocho semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra modalidad, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente doce semanas (o al menos doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra modalidad, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos

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

La capacidad del anticuerpo para aliviar el dolor en un sujeto se puede valorar usando ensayos establecidos en el arte. Los modelos animales adecuados para valorar la duración del alivio de dolor por un anticuerpo anti-NGF se describen en, por ejemplo, Publicación PCT No. WO 2006/131951 y Publicación de Patente de Estados Unidos 20080182978. Los ejemplos no limitantes de tales modelos animales incluyen un modelo de dolor neuropático evocado por constricción crónica del nervio ciático, un modelo de dolor post-quirúrgico que involucra la incisión de una pata trasera, un modelo de dolor por artritis reumatoide que involucra artritis inducida por adyuvante de Freund completo (CFA) y modelos de dolor por cáncer tales como se describen en Halvorson, K.G. *et al.* (2005) *Cancer Res.* 65:9426-9435 y Sevcik, M.A. *et al.* (2005) *Pain* 115:128-141. Además, el alivio de dolor se puede evaluar clínicamente en humanos y la duración del alivio de dolor se puede determinar con base en los niveles de dolor reportados

por los sujetos humanos que son tratados con el anticuerpo anti-NGF.

En todavía otras modalidades, un anticuerpo anti-NGF de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF descrito en el arte. Por ejemplo, una región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF como se describe en la Publicación PCT No. WO 2001/78698, Publicación PCT No. WO 2001/64247, Publicación PCT No. WO 2002/096458, Publicación PCT No. WO 2004/032870, Publicación PCT No. WO 2004/058184, Publicación PCT No. WO 2005/061540, Publicación PCT No. WO 2005/019266, Publicación PCT No. WO 2006/077441, Publicación PCT No. WO 2006/131951, Publicación PCT No. WO 2006/110883, Publicación PCT No. WO 2009/023540, Patente de Estados Unidos No. 7,449,616; Publicación de Estados Unidos No. US 20050074821, Publicación de Estados Unidos No. US 20080033157, Publicación de Estados Unidos No. US 20080182978 o Publicación de Estados Unidos No. US 20090041717 se puede usar en un anticuerpo anti-NGF de la invención.

En todavía otras modalidades, un anticuerpo anti-NGF de la invención puede comprender una región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF que se prepara por un método estándar conocido en el arte para mejorar anticuerpos monoclonales,

tal como la técnica estándar de hibridación de célula somática descrita por Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495 para crear anticuerpos monoclonales no humanos (los anticuerpos luego pueden ser humanizados), así como también métodos o técnicas de biblioteca de expresión en fagos usando animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana. Las técnicas de biblioteca de expresión en fagos para seleccionar anticuerpos se describen en, por ejemplo, McCafferty *et al., Nature,* 348:552-554 (1990). Clarkson et al, Nature, 352:624-628 (1991), Marks *et al, J. Mol. Biol,* 222:581-597 (1991) y Hoet et al (2005) *Nature Biotechnology* 23, 344-348; Patentes de Estados Unidos Nos. 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 de Ladner *et al.*; Patentes de Estados Unidos Nos. 5,427,908 y 5,580,717 de Dower *et al.*; Patentes de Estados Unidos Nos. 5,969,108 y 6,172,197 de McCafferty *et al.*; y Patentes de Estados Unidos Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 de Griffiths *et al.* Los métodos para usar animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humanos para mejorar anticuerpos se describen en, por ejemplo, Lonberg, *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. NY. Acad. Sci.* 764:536-546; Patentes de Estados Unidos Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429;

todas de Lonberg and Kay; Patente de Estados Unidos No. 5,545,807 de Surani *et al.*; Publicaciones PCT Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg and Kay; Publicación PCT WO 02/43478 de Ishida *et al.*, Patentes de Estados Unidos Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 y 6,162,963 de Kucherlapati *et al.*

En varias modalidades, un anticuerpo anti-NGF de la invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Además, el anticuerpo puede ser uno en el cual los epítopes de célula T potenciales se han eliminado. Los métodos para eliminar los epítopes de célula T potenciales para reducir la inmunogenicidad potencial de un anticuerpo se han descrito en el arte (ver por ejemplo, Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20030153043 de Carr *et al.*).

Un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se puede derivar o enlazar a otra molécula funcional (*por ejemplo*, otro péptido o proteína). Por consiguiente, los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención se proponen para incluir formas derivadas y de otra manera modificadas de los anticuerpos PG110 descritos en la presente. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se puede enlazar funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no

covalente o de otra forma) a una o más otras entidades moleculares, tal como otro anticuerpo (*por ejemplo*, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región de núcleo de estreptavidina o una marca de polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivado se produce reticulando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, *por ejemplo*, para crear anticuerpos biespecíficos). Los reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterofuncionales, que tienen dos grupos distintamente reactivos separados por un espaciador apropiado (*por ejemplo*, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) o homobifuncional (*por ejemplo*, suberato de disuccinimidilo). Tales enlazantes están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Los agentes detectables útiles con los cuales un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se puede derivar incluyen compuestos fluorescentes. Los agentes detectables fluorescentes ejemplares incluyen fluoresceína, isocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también se puede derivar con enzimas

detectables; tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se deriva con una enzima detectable, se detecta agregando reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando el agente detectable peroxidasa de rábano picante está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, el cual es detectable. Un anticuerpo también se puede derivar con biotina, y se detecta a través de la medición indirecta del enlace de avidina o estreptavidina.

III. <u>Producción de Anticuerpo</u>

Otro aspecto de esta descripción pertenece a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de esta descripción. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es "aislado" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, *por ejemplo*, otras proteínas o ácidos nucleicos celulares, por técnicas estándares, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía de columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en el arte. *Ver*, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987)

Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de esta descripción puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no puede contener secuencias intrónicas. En una modalidad preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc. Los ácidos nucleicos de esta descripción se pueden obtener usando técnicas estándares de biología molecular.

Una molécula de ácido nucleico preferida de la invención comprende la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 11. Otra molécula de ácido nucleico preferida de la invención comprende la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 14.

Una vez que se obtienen los fragmentos que codifican los segmentos V_H y V_L, estos fragmentos de ADN se pueden manipular adicionalmente por técnicas estándares de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de región variable a genes de cadena de anticuerpo de longitud completa de modo que la región variable es operativamente enlazada a la región constante (ver *por ejemplo*, Ejemplo 1). El término "operativamente enlazado", como se usa en este contexto, se propone que signifique que los dos fragmentos de ADN se unen de modo que las secuencias de aminoácido codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el armazón.

Los anticuerpos se pueden producir en una célula

huésped usando métodos conocidos en el arte (*por ejemplo*, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202). Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, los ADNs que codifican las cadenas pesada y ligera se pueden insertar en vectores de expresión de modo que los genes se enlazan operativamente a secuencias de control transcripcionales y traduccionales. En este contexto, el término "operativamente enlazado" se propone que signifique que un gen de anticuerpo sea ligado en un vector de modo que las secuencias de control transcripcionales y traduccionales dentro del vector sirven para su función propuesta de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y secuencias de control de expresión se eligen para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo se pueden insertar en el vector separado o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándares (*por ejemplo*, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y vector, o ligación de extremo romo si no están presentes sitios de restricción). Adicionalmente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo de una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo se puede

clonar en el vector de modo que el péptido se enlaza en armazón al amino término del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (*es decir*, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante típicamente portan secuencias regulatorias que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia regulatoria" se propone que incluya promotores, mejoradores y otros elementos de control de expresión (*por ejemplo*, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias regulatorias se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Se apreciará por aquellos expertos en el arte que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias regulatorias, puede depender de tales factores como la elección de la célula huésped a ser transformada, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias regulatorias preferidas para la expresión de célula huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o mejoradores derivados de

citomegalovirus (CMV), Virus de Simio 40 (SV40), adenovirus, (*por ejemplo*, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polioma). Alternativamente, se pueden usar secuencias regulatorias no virales, tales como el promotor de ubiquitina o promotor de β-globina. Aún adicionalmente, los elementos regulatorios compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tal como el sistema promotor SRα, el cual contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga de virus de leucemia de célula T tipo 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias regulatorias, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tal como la secuencia que regula la replicación del vector en células huésped (*por ejemplo*, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las cuales el vector se ha introducido (*ver*, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tal como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la cual el vector se ha introducido. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped de dhfr con

selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

Para expresión de las cadenas ligera y pesada, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera son transfectados en una célula huésped por técnicas estándares. Las diversas formas del término "transfección" se proponen que abarquen una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, *por ejemplo*, electroporación, precipitación por fosfato de calcio, transfección por DEAE-dextrano y smilares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos en células huésped ya sea procariotas o eucariotas, la expresión de los anticuerpos en células eucariotas, y muy preferiblemente células huésped de mamífero, es lo más preferido debido a que tales células eucariotas, y en particular células de mamífero, sea más probable que las células procariotas se ensamblen y secreten un anticuerpo inmunológicamente activo y apropiadamente plegado. La expresión procariota de los genes de anticuerpo se ha reportado que es inefectiva para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de esta descripción incluyen células de Ovarios de Hámster Chino (células CHO)

(incluyendo células CHO de dhfr, descritas en Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de gen GS descrito en WO 87/04462 (de Wilson), WO 89/01036 (de Bebbington) y EP 338,841 (de Bebbington). Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped por un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual las células huésped crecen. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos estándares de purificación de proteína.

En una modalidad preferida, la invención proporciona un vector de expresión que codifica un anticuerpo anti-NGF, en donde el vector de expresión comprende la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 11 que codifica una cadena pesada de anticuerpo y la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 14 que codifica una cadena ligera de anticuerpo. Un vector de expresión preferido de la invención comprende el gen GS (glutamina sintetasa). En otra modalidad

preferida, la invención proporciona una célula huésped que comprende un vector de expresión de la invención. Una célula huésped preferida de la invención es una célula CHO (Ovario de Hámster Chino). En todavía otra modalidad preferida, la invención proporciona un método para expresar un anticuerpo anti-NGF que comprende cultivar una célula huésped que comprende un vector de expresión que comprende la secuencia de la SEC ID NO: 11 (que codifica una cadena pesada de anticuerpo) y la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 14 (que codifica una cadena ligera de anticuerpo) de modo que se expresa un anticuerpo anti-NGF que comprende una cadena pesada codificada por la SEC ID NO: 11 y una cadena ligera codificada por la SEC ID NO: 14.

En todavía otro aspecto, la invención pertenece a un proceso para producir un anticuerpo anti-NGF el cual tiene una mutación en una región constante del anticuerpo (por ejemplo, una mutación de región bisagra), el proceso comprende introducir la mutación apropiada en la región constante, por ejemplo por técnicas estándares de ADN recombinante. Por ejemplo, la invención proporciona un proceso para producir un anticuerpo anti-NGF, en donde el anticuerpo comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs

1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10 (y, por ejemplo, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días, o adicionalmente o alternativamente, tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, o al menos 35 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de al menos cuatro a seis semanas, o en un intervalo de cuatro a seis semanas, o en un intervalo de al menos cuatro a siete semanas, o en un intervalo de cuatro a siete semanas, o en un intervalo de al menos cuatro a ocho semanas o en un intervalo de cuatro a ocho semanas), en donde el proceso para producir el anticuerpo comprende mutar la serina en la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9 a prolina para crear la región constante de IgG4 humana que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10. Preferiblemente, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1. Preferiblemente, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2. Preferiblemente, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 13. Preferiblemente, la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 16.

IV. Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, *por ejemplo*, una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo de la invención formulada junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En modalidades preferidas, la composición farmacéutica es adecuada para la administración intravenosa, subcutánea (*por ejemplo*, vía una pluma de inyección) o intra-articular, aunque otras rutas de administración adecuadas se describen en la presente. En una modalidad, la composición puede incluir una combinación de múltiples (*por ejemplo*, dos o más) anticuerpos de la invención, por ejemplo anticuerpos que enlazan diferentes epítopes en el NGF.

Como se usa en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, sales, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo se puede revestir en un material para proteger al compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a

una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto progenitor y no imparte algunos efectos toxicológicos indeseados (ver *por ejemplo*, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como también de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos sustituidos por fenilo, ácidos hidroxi alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos aromáticos y alifáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como también de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar solas o terapia de combinación, *es decir*, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos uno o más agentes farmacéuticos adicionales. Por ejemplo, al menos uno o más agentes farmacéuticos adicionales se pueden administrar separadamente

o también se pueden incorporar en las composiciones. En una modalidad preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención se administra en combinación con un segundo agente farmacéutico, en donde el segundo agente farmacéutico se selecciona del grupo que consiste de NSAIDs, analgésicos (incluyendo analgésicos opioides y analgésicos atípicos), anestésicos locales, bloqueos de nervios, bloqueos de fenol, anticuerpos terapéuticos, esteroides, anti-convulsivos, anti-depresivos, capsaicina tópica y agentes antivirales. Una clase particularmente preferida de segundos agentes farmacéuticos para uso en el alivio de dolor son los analgésicos opioides. Adicionalmente o alternativamente, un segundo régimen de tratamiento se puede combinar con el uso de un anticuerpo de la invención, por ejemplo en el alivio de dolor. Los ejemplos de tales segundos regímenes de tratamiento incluyen radioterapia (*por ejemplo*, para dolor de cáncer), procedimientos quirúrgicos (*por ejemplo*, procedimientos ablativos (aguja) retrogasserianos o ganglio gasseriano para neuralgia trigeminal), hipnosis y acupuntura.

Los ejemplos de NSAIDS incluyen salicilatos acetilados incluyendo aspirina; salicilatos no acetilados incluyendo salsalato, diflunisal; ácidos acéticos incluyendo etodolaco, diclofenaco, indometacin, cetorolaco, nabumetona; ácidos propiónicos incluyendo fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, naproxeno, naproxeno sódico,

oxaprozin; fenamatos incluyendo meclofenamato, ácido mefanámico; fenilbutazona, piroxicam; inhibidores de COX-2 incluyendo celecoxib, etoricoxib, valdecoxib, rofecoxib, lumiracoxib. Los ejemplos de analgésicos incluyen paracetamol acetaminofeno), tramadol, tapentadol, cpasaicina (tópica), analgésicos opioides y analgésicos atípicos. Los ejemplos de analgésicos opioides incluyen morfina, codeína, tebaína, hidromorfona, hidrocodona, oxicodona, oximorfona, desomorfina, diacetilmorfina, nicomorfina, dipropanoilmorfina, bencilmorfina, etilmorfina, fentanilo, petidina, metadona, tramadol y propoxifeno. Los ejemplos de analgésicos atípicos incluyen antidepresivos tricíclicos, carbazepina, gabapentina, pregabalina, duloxetina y cafeína. Los ejemplos de esteroides incluyen corticoesteroides intraarticulares (IACs) y prednisona. Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos incluyen anticuerpos anti-TNF, tales como Remicade® y Humira®, y anticuerpos anti-CD20, tales como Rituxan® y Arzerra™. Los ejemplos de agentes antivirales incluyen aciclovir y fosfato de oseltamivir (Tamiflu®).

En una modalidad preferida, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-NGF de la presente invención con al menos uno o más inhibidores de TrkA (*por ejemplo*, compuestos que antagonizan la actividad de TrkA). Los inhibidores de TrkA pueden funcionar, por ejemplo, interactuando extracelularmente con el receptor de TrkA, o

interactuando intracelularmente con la maquinaría de transducción de señalización de TrkA (*por ejemplo*, inhibición de la actividad de cinasa TrkA). Los ejemplos no limitantes de inhibidores de TrkA extracelular incluyen anticuerpos anti-TrkA (tales como anticuerpos anti-TrkA humanizados descritos en la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20090208490 y Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20090300780) y miméticos de péptido de NGF que antagonizan TrkA (tal como se describe en Debeir, T. *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 96:4067-4072). Los ejemplos no limitativos de inhibidores de TrkA intracelulares incluyen péptidos de penetración celular que antagonizan la función de TrkA (por ejemplo, como se describen en Hirose, M. *et al.* (2008) *J. Pharmacol. Sci.* 106:107-113; Ueda, K. *et al.* (2010) *J. Pharmacol. Sci.*, editado el 30 de Marzo de 2010) e inhibidores de moléculas pequeñas tales como inhibidores de TrkA cinasa (por ejemplo, como se describe en Wood, E.R. *et al.* (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14:953-957; Tripathy, R. *et al.* (2008) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18:3551-3555). Otros ejemplos no limitativos de inhibidores de TrkA incluyen ARRY-470 y ARRY-872 (Array Biopharma).

En otra modalidad preferida, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-NGF de la presente invención con al menos uno o más inhibidores de Proteína Cinasa C (PKC) (por ejemplo, los compuestos que

antagonizan la actividad de PKC).

Una composición de la presente invención se puede administrar por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la técnica, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Preferiblemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intra-articular, subcutánea, intramuscular, parenteral, intra-tumoral, intranasal, intravesicular, intrasinovial, oral, mucosal, sublingual, espinal o epidérmica o por instalación en cavidades del cuerpo (por ejemplo, abdomen, cavidad pleural, senos nasales), o en la superficie del ojo, o en los pulmones por administración por inhalación. Para vías particulares de administración, se puede elegir para uso un dispositivo de suministro adecuado. Por ejemplo, para administración subcutánea o intramuscular, se puede usar una pluma para inyección (por ejemplo, que puede ser autoadministrada). Tales plumas para inyección, también referidas como inyectores, son bien conocidos en la técnica, incluyendo aquellos que contienen una dosis líquida del anticuerpo (tal como la pluma para inyección de un solo uso utilizada para administrar Humira® y, en forma más preferida, aquellos que contienen la dosis sólida del anticuerpo que es reconstituida en una forma líquida inmediatamente previo a la inyección. También para administración subcutánea, se puede usar un

implante subcutáneo. Adicionalmente, el suministro transcutáneo se puede lograr por el uso de un parche cutáneo tópico (piel) (por ejemplo, parche adhesivo). El suministro subcutáneo también se puede lograr por la inyección de polvo seco (tal como inyectores comercialmente disponibles de Glide Pharma). Aún más, para el suministro en los pulmones (por ejemplo, en el tratamiento de asma o tos intratable), se puede usar una solución nebulizada en un dispositivo de nebulización.

Los compuestos activos se pueden preparar con portadores que protegerán al compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación liberada controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro de microencapsulado. Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilen vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son patentados o generalmente conocidos por aquellos expertos en la técnica. *Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Para administrar un compuesto de la invención por ciertas rutas de administración, puede ser necesario revestir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un

material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede ser administrado a un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas y amortiguadoras acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones de agua en aceite en agua CGF así como también liposomas convencionales (Strejan *et al.* (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen dispersiones o soluciones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Salvo en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea compatible con el compuesto activo, se considera el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de manufactura y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada a una alta concentración del fármaco. El portador puede ser un medio de dispersión o solvente que contiene, por

ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. El fluido apropiado se puede mantener, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo incluyendo en la composición un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con un o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, como sea requerido, seguido por microfiltración para esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelamiento (liofilización) que

producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo filtrada previamente estéril.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un bolo único se puede administrar, varias dosis divididas se pueden administrar a través del tiempo o la dosis se puede reducir de manera proporcional o incrementar como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Una dosis única típica (la cual se puede administrar en un programa de dosificación como se describe más adelante) podría variar desde aproximadamente cualquiera de 0.1 µg/kg a 1 µg/kg a 30 µg/kg a 300 µg/kg a 3000 µg/kg (3 mg/kg), a 30 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores descritos en la presente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF se puede administrar a aproximadamente 1 µg/kg, aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 20 µg/kg, aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 200 µg/kg, aproximadamente 300 µg/kg, aproximadamente 400 µg/kg, aproximadamente 500 µg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, o aproximadamente 3 mg/kg, En una modalidad preferida, el anticuerpo anti-NGF es administrado a una dosis en un intervalo desde aproximadamente 3 µg/kg a aproximadamente 3000 µg/kg. En otra modalidad preferida, el

anticuerpo anti-NGF se administra a una dosis de 100 µg/kg. En otra modalidad preferida, el anticuerpo anti-NGF se administra a una dosis de 200 µg/kg. En otra modalidad preferida, el anticuerpo anti-NGF se administra a una dosis de 300 µg/kg. En otra modalidad preferida, el anticuerpo anti-NGF se administra a una dosis de 400 µg/kg.

Para administraciones repetidas por varios días, semanas o meses o más tiempo, dependiendo de la afección, el tratamiento es mantenido hasta que una supresión deseada de síntomas ocurre o hasta que se alcanzan los niveles terapéuticos suficientes (por ejemplo, reducción del dolor). Un régimen de dosificación ejemplar comprende administrar una dosis inicial en un intervalo de aproximadamente 3 µg/kg a 500 µg/kg, seguido por una dosis de mantenimiento mensual de aproximadamente 3 µg/kg a 500 µg/kg del anticuerpo anti-NGF. En otra modalidad, una dosis de aproximadamente 200 µg/kg se administra una vez cada mes. En todavía otra modalidad, una dosis de aproximadamente 400 µg/kg se administra una vez cada dos meses. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles, dependiendo de la configuración de retardo farmacocinético que el médico desee lograr. Por ejemplo, en algunas modalidades, se contempla la dosificación de una a cuatro veces por semana. Sin embargo, dada la larga duración del alivio del dolor por los anticuerpos anti-NGF, se puede

usar menos dosificación frecuente. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-NGF se administró una vez cada semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez cada 5 semanas, una vez cada 6 semanas, una vez cada 7 semanas, una vez cada 8 semanas, una vez cada 9 semanas, una vez cada 10 semanas, una vez cada 15 semanas, una vez cada 20 semanas, una vez cada 25 semanas, una vez cada 26 semanas, o más tiempo. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-NGF se administra una vez por 1 mes, una vez cada 2 meses, una vez cada 3 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 5 meses, una vez cada 6 meses, o más tiempo.

Como se describe además en el Ejemplo 6, en una modalidad preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención se administra (por ejemplo a un humano) intravenosamente a una dosis en un intervalo de 0.1 mg/kg a 0.2 mg/kg, de manera preferible 0.15 mg/kg, una vez cada 12 semanas. En otra modalidad preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención se administra (por ejemplo, a un humano) subcutáneamente a una dosis en un intervalo de 0.2 mg/kg a 0.4 mg/kg, preferiblemente 0.3 mg/kg, una vez cada doce semanas. En todavía otras modalidades, un anticuerpo anti-NGF de la invención se administra a una dosis en un intervalo de 0.1 mg/kg a 3 mg/kg, o en un intervalo de 0.1 mg/kg a 30 mg/kg, o en un intervalo de 0.1 mg/kg a 20 mg/kg, o en un intervalo de 0.1 mg/kg a 10 mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 30

mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 20 mg/kg o en un intervalo de 1 mg/kg a 10 mg/kg.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención se dictan por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de componer un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos. Por ejemplo, los ejemplos no limitativos de las formas de dosificación unitaria incluyen 0.2 mg (correspondientes a una dosis de 3 µg/kg en una persona de aproximadamente 70 kg), 2 mg (que corresponden a una dosis de 30 µg/kg en una persona de aproximadamente 70 kg) y 7 mg (que corresponden a una dosis de 100 µg/kg en una persona de aproximadamente 70 kg).

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua,

tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metal, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamin tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en la forma de dosis unitaria y se pueden preparar por cualesquiera métodos conocidos en el arte de la farmacia. La forma de dosificación unitaria como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéuticamente requerido. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación unitaria variará dependiendo del sujeto a ser tratado, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única generalmente será aquélla

cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente 0.001 por ciento a aproximadamente noventa por ciento del ingrediente activo, de manera preferible desde aproximadamente 0.005 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, de forma más preferible desde aproximadamente 0.01 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

Las frases "administración parenteral" y administrada parenteralmente" como se usa en la presente significa modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Las fluidez

apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y por el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como preservativos, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Los ejemplos particulares de adyuvantes que son bien conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, adyuvantes inorgánicos (tales como sales de aluminio, por ejemplo, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio), adyuvantes orgánicos (por ejemplo escualeno), adyuvantes a base de aceite, virosomas (por ejemplo virosomas que contienen una neuraminidasa y hemaglutinina unida a la membrana derivada del virus de la influenza).

La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto por procedimientos de esterilización, *supra*, como por la inclusión de varios agentes antibacteriales y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede llevar a cabo por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y

gelatina.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como farmacéuticos, a humanos y animales, los mismos se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0.001 a 90% (en forma más preferible, 0.005 a 70%, tal como 0.01 a 30%) de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

A pesar de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden ser usados en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por aquellos de experiencia en la técnica.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden variar a fin de obtener una cantidad del ingrediente activo la cual sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración particular, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, o el éster,

sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que sea empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas. Un médico o veterinario que tiene experiencia ordinaria en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores que aquellos requeridos para alcanzar el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis adecuada diaria de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto la cual es la dosis más inferior efectiva para producir un efecto terapéutico. Una dosis efectiva generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad preferida, una composición terapéutica de la invención se puede administrar con un

dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824, o 4,596,556. Los ejemplos de módulos e implantes bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la Patente Norteamericana No. 4,487,603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispersar el medicamento a una velocidad controlada; la Patente Norteamericana No. 4,486,194, que describe un dispositivo terapéutico para la administración de medicamentos a través de la piel; la Patente Norteamericana No. 4,447,233, que describe una bomba de infusión de medicamento para administrar el medicamento a una velocidad de infusión precisa; la Patente Norteamericana No. 4,447,224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para continuar el suministro del fármaco; la Patente Norteamericana No. 4,439,196, que describe un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene compartimientos de cámaras múltiples; y la Patente Norteamericana No. 4,475,196, que describe un sistema de suministro del fármaco osmótico. Muchos otros implantes, sistemas de administración, y módulos son conocidos por aquellos de experiencia en la técnica.

En ciertas modalidades, los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden formular para asegurar la distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera sangre-

cerebro (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), los mismos se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de manufactura de liposomas, *ver, por ejemplo,* las Patentes Norteamericanas 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones los cuales se transportan de manera selectiva en órganos o células específicas, por consiguiente mejoran el suministro del fármaco objetivo (*ver, por ejemplo;* V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Las porciones de objetivo ejemplares incluyen folato o biotina (*ver, por ejemplo,* Patente Norteamericana 5,416,016 de *Low et al.*); manosidas (*Umezawa et al,* (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); el receptor de proteína A tensioactivo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), especies diferentes de las cuales pueden comprender las formulaciones de las invenciones, así como también componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); ver también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

V. Métodos de Uso de Anticuerpos de la Invención

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar, *por ejemplo*, atenuar o inhibir una afección o enfermedad relacionada con NGF en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo anti-NGF de la invención. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NGF se usa para atenuar o aliviar el dolor, *por ejemplo*, dolor asociado con una enfermedad o afección en donde el desarrollo o mantenimiento del dolor es mediado, al menos en parte, por NGF. Los ejemplos no limitativos de la afección o enfermedad relacionada con NGF incluye dolor inflamatorio, dolor post-quirúrgico, dolor post-operatorio (incluyendo dolor dental), dolor neuropático, neuropatía periférica, neuropatía diabética, dolor por fractura, dolor de articulaciones por gota, neuralgia post-herpética, dolor por cáncer, dolor por osteoartritis o artritis reumatoide, ciática, dolores asociados con crisis de células falsiformes, dolores de cabeza (*por ejemplo*, migrañas, dolor de cabeza por tensión, cefalea histamínica), disminorrea, endometriosis, fibromas uterinos, dolor musculoesquelético, dolor lumbar crónico, fibromialgia, esguinces, dolor visceral, quistes de ovario, prostatitis, síndrome de dolor pélvico crónico, cistitis, cistitis intersticial, síndrome de vejiga dolorosa y/o síndrome de dolor de vejiga, dolor asociado con prostatitis no bacteriana crónica, dolor en la incisión, migraña,

neuralgia del trigémino, dolor de quemaduras y/o heridas, dolor asociado con trauma, dolor asociado con enfermedades musculoesqueléticas, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor de metástasis ósea, dolor de VIH, eritromelalgia o dolor causado por pancreatitis o piedras en el riñón, melanoma maligna, síndrome de Sjogren, asma, (por ejemplo, asma no controlada con hiperreactividad bronquial severa), tos intratable, enfermedades desmielinizantes, alcoholismo crónico, apoplejía, síndrome de dolor talámico, dolor por toxinas, dolor por quimioterapia, fibromialgia, trastornos inflamatorios del intestino, síndrome de intestino irritable, trastornos inflamatorios de los ojos, trastornos inflamatorios de vejiga o vejiga inestable, psoriasis, afecciones de la piel con componentes inflamatorios, quemadura del sol, carditis, dermatitis, miositis, neuritis, enfermedades vasculares del colágeno, condiciones inflamatorias crónicas, dolor inflamatorio e hiperalgesia y alodinia asociadas, dolor neuropático y alodinia o hiperalgesia asociadas, dolor neuropático diabético, causalgia, dolor mantenido simpáticamente, síndromes de desaferentación, daño o disfunción del tejido epitelial, alteraciones de la motilidad visceral en regiones respiratoria, genitourinaria, gastrointesinal o vascular, reacciones alérgicas de la piel, pruritis, vitíligo, trastornos gastrointestinales generales, colitis, ulceración

gástrica, úlceras duodenales, vasomotor o rinitis alérgica, trastornos bronquiales, dispepsia, reflujo gastroesofágico, pancreatitis y visceralgia.

Además, NGF se ha implicado en la proliferación de cánceres tales como cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, prolactinoma y melanoma. Por consiguiente, en otra modalidad, la enfermedad o afección relacionada con NGF que se pueden tratar usando un anticuerpo anti-NGF de la invención es cáncer, preferiblemente cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, prolactinoma o melanoma. Por consiguiente, en otra modalidad, la invención también proporciona un método para tratar cáncer en un sujeto, preferiblemente cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, prolactinoma o melanoma, que comprende administrar un anticuerpo anti-NGF de la invención al sujeto.

Aún más, en otra modalidad, la enfermedad o afección relacionada con NGF puede ser VIH/SIDA. El bloqueo de NGF que usa un anticuerpo anti-NGF de la invención puede bloquear macrófagos infectados con VIH, tratando así VIH/SIDA. Por consiguiente, en otra modalidad, la invención también proporciona un método para tratar VIH/SIDA en un sujeto, que comprende administrar un anticuerpo anti-NGF de la invención al sujeto.

Las enfermedades y condiciones particularmente

preferidas para el tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención incluyen dolor inflamatorio (particularmente dolor por osteoartritis o artritis reumatoide), dolor musculoesquelético (particularmente dolor lumbar crónico), dolor por cáncer, dolor neuropático (dolor neuropático particularmente diabético), dolor de metástasis ósea, cistitis intersticial/síndrome de vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis no bacterial crónica, dolor de endometriosis y/o fibromas uterinos, y dolor postoperatorio.

El dolor y/u otros síntomas asociados con la endometriosis y/o fibromas uterinos pueden comprender dismenorrea; dolor pélvico crónico no menstrual; dispareunia; disquexia; menorragia; dolor de espalda o abdominal inferior; infertilidad y subfertilidad; disuria; hinchazón y dolor en la micción; náusea, vómito y/o diarrea. Los síntomas también pueden comprender síntomas relacionados con lesiones endometrióticas o fibromas localizados fuera de la cavidad peritoneal incluyendo por ejemplo el síndrome de endometriosis torácica manifestado como hemoptisis, neumotórax o hemotórax, y leiomiosis pulmonar manifestada como disnea y una masa pulmonar.

En una modalidad particularmente preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención es usado para tratar el dolor. Preferiblemente, el tipo de dolor tratado se selecciona del grupo que consiste de dolor por osteoartritis,

dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer y endometriosis y/o dolor por fibromas uterinos. Por consiguiente, en una modalidad preferida, la invención proporciona un método para tratar dolor en un sujeto, que comprende administrar un anticuerpo anti-NGF de la invención de tal manera que el dolor en el sujeto es tratado. Preferiblemente, el dolor se selecciona del grupo que consiste de dolor por osteoartritis, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer y endometriosis y/o dolor por fibromas uterinos. Por consiguiente, en una modalidad, la invención proporciona un método de tratamiento del dolor osteoartrítico en un sujeto que comprende administrar un anticuerpo anti-NGF de la invención de tal modo que el dolor osteoartrítico en el sujeto es tratado. En otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar el dolor lumbar crónico en un sujeto que comprende administrar un anticuerpo anti-NGF de la invención de manera que el dolor lumbar crónico en el sujeto es tratado. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar el dolor neuropático diabético en un sujeto que comprende administrar un anticuerpo anti-NGF de la invención de modo que el dolor neuropático diabético en el sujeto es tratado. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar el dolor por cáncer en un sujeto que comprende administrar un anticuerpo anti-NGF de la invención

de tal manera que el dolor por cáncer en el sujeto es tratado. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un método para tratar el dolor por endometriosis y/o fibroma uterino en un sujeto que comprende administrar un anticuerpo anti-NGF de la invención de modo que el dolor por endometriosis o fibroma uterino en el sujeto es tratado.

En otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF como se describe en la presente para tratar una enfermedad relacionada con NGF. Los ejemplos no limitativos de las enfermedades o condiciones relacionadas con NGF incluyen aquellas listadas anteriormente. En otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF como se describe en la presente para el tratamiento del dolor. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF como se describe en la presente para el tratamiento del dolor seleccionado del grupo que consiste de dolor osteoartrítico, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer y dolor por endometriosis y/o fibromas uterinos. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF como se describen en la presente para el tratamiento del dolor osteoartrítico. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF como se describe en la presente para el tratamiento del dolor lumbar crónico. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF

como se describe en la presente para el tratamiento de dolor neuropático diabético. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF como se describe en la presente para el tratamiento de dolor por cáncer. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF como se describe en la presente para el tratamiento de dolor por endometriosis y/o fibromas uterinos. En una modalidad particular, la invención proporciona un método para atenuar o inhibir el dolor en un sujeto, el método comprende administrar a un sujeto un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10, y en donde el anticuerpo alivia el dolor en el sujeto por una duración de al menos aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas (o al menos cuatro a doce semanas, o al menos cuatro semanas, o al menos ocho semanas, o al menos doce semanas, o por una a doce semanas, o por cuatro a doce semanas o por ocho a doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. Preferiblemente, el dolor se selecciona del grupo que consiste de dolor osteoartrítico, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor por endometriosis y dolor por fibromas uterinos. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NGF se administra a una

dosis en un intervalo desde aproximadamente 0.1 mg/kg a 3 mg/kg, o de 0.1 mg/kg a 3 mg/kg, o de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, o de 0.1 mg/kg a 30 mg/kg o a uno de los otros intervalos de dosificación descritos en la presente.

En otra modalidad particular, la invención proporciona un método para atenuar o inhibir una enfermedad o afección relacionada con un factor de crecimiento nervioso (NGF) en un sujeto de manera que un efecto de rebote se evita en el sujeto, el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende una mutación de la región de bisagra a la posición del aminoácido 108 de SEC ID NO:9, y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un humano de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, o al menos 15 días, o al menos 20 días, o al menos 25 días, o al menos 30 días, o al menos 40 días, o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días, o en un intervalo de 10-40 días, o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días, o en un intervalo de 15-30 días), en donde el anticuerpo se administra al sujeto a una dosis y a una frecuencia de tal manera que un efecto de rebote se evita en el sujeto. Preferiblemente, la serina en la posición de aminoácido 108 de SEC ID NO:9 es mutada a prolina.

Preferiblemente, la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 10. Preferiblemente, el anticuerpo compite para unir a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2. Preferiblemente, la enfermedad o afección relacionada con NGF es dolor seleccionado del grupo que consiste de dolor osteoartrítico, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer y dolor por endometriosis y/o dolor por fibromas uterinos. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NGF se administra a una dosis en un intervalo desde aproximadamente 0.001 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, en forma más preferida de 0.1 mg/kg a 3 mg/kg, o a uno de los otros intervalos de dosis descritos en la presente. En forma más preferible, para evitar un efecto de rebote, el anticuerpo se administra a un intervalo de dosis inferior, por ejemplo en un intervalo de 0.001 mg/kg a 1 mg/kg, o en un intervalo de 0.001 mg/kg a 1 mg/kg o en un intervalo de 0.001 mg/kg a 0.5 mg/kg o en un intervalo de 0.001 mg/kg a 0.3 mg/kg, o en un intervalo de 0.01 mg/kg a 1 mg/kg o en un intervalo de 0.01 mg/kg a 0.5 mg/kg o 0.01 mg/kg a 0.3 mg/kg. En forma más preferible, para evitar un efecto de rebote, el anticuerpo se administra a un intervalo de dosificación inferior (como se

describió anteriormente) y a intervalos más frecuentes, tales como una vez cada semana, o una vez cada dos semanas, o una vez cada cuatro semanas.

La invención también proporciona el uso del anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para uso para atenuar o inhibir una enfermedad o afección relacionada con NGF en un sujeto. Los ejemplos no limitativos de las enfermedades o condiciones relacionadas con NGF incluyen aquellas enumeradas anteriormente. En otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de dolor. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para tratar el dolor seleccionado del grupo que consiste de dolor osteoartrítico, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer y dolor por endometriosis y/o dolor por fibromas uterinos. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de dolor osteoartrítico. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de dolor lumbar crónico. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un

medicamento para el tratamiento de dolor neuropático diabético. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento del dolor por cáncer. En todavía otra modalidad, la invención proporciona un anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento del dolor por endometriosis y/o fibromas uterinos. En una modalidad preferida, el anticuerpo anti-NGF se administra a una dosis en un intervalo de aproximadamente 3 µg/kg a aproximadamente 3000 µg/kg, o a una dosis de 100 µg/kg, o a una dosis de 300 µg/kg. En otra modalidad preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención se administra (por ejemplo, a un humano) intravenosamente a una dosis en un intervalo de 0.1 mg/kg a 0.2 mg/kg, preferiblemente 0.15 mg/kg, una vez cada 12 semanas. En otra modalidad preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención se administra (por ejemplo, a un humano) subcutáneamente a una dosis en un intervalo de 0.2 mg/kg a 0.4 mg/kg, preferiblemente 0.3 mg/kg, una vez cada doce semanas. En todavía otras modalidades, un anticuerpo anti-NGF de la invención se administra a una dosis en un intervalo de 0.1 mg/kg a 3 mg/kg, o en un intervalo de 0.1 mg/kg a 30 mg/kg, o en un intervalo de 0.1 mg/kg a 20 mg/kg, o en un intervalo de 0.1 mg/kg a 10 mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 30 mg/kg, o en un intervalo de 1 mg/kg a 20 mg/kg o

en un intervalo de 1 mg/kg a 10 mg/kg. Sin embargo, otros intervalos de dosis adecuadas y dosis se describieron anteriormente en la sección de composiciones farmacéuticas.

En una modalidad preferida, el anticuerpo anti-NGF se administra intravenosamente. En otra modalidad preferida, el anticuerpo anti-NGF se administra subcutáneamente o intra-articularmente. Sin embargo, otras vías de administración adecuadas se describieron anteriormente en la sección de composiciones farmacéuticas.

En una modalidad preferida, un anticuerpo anti-NGF de la invención alivia el dolor en un sujeto al cual el anticuerpo se administra para una larga duración. Por ejemplo, en una modalidad, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos una semana a aproximadamente doce semanas (o por al menos una semana a doce semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra modalidad, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente una semana (o al menos una semana) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra modalidad, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente dos semanas (o al menos dos semanas) después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto. En otra modalidad, el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente cuatro

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

En otra modalidad, el anticuerpo anti-NGF se administra conjuntamente con un segundo agente farmacéutico o un segundo régimen de tratamiento. El anticuerpo y el segundo agente, o el anticuerpo y el segundo régimen de tratamiento, se pueden administrar o realizar de manera simultánea o, alternativamente, el anticuerpo se puede administrar primero,

seguido por el segundo agente farmacéutico o segundo régimen, o el segundo régimen o agente farmacéutico se puede administrar o realizar primero, seguido por el anticuerpo. Los ejemplos no limitativos de los segundos agentes farmacéuticos adecuados y segundos regímenes de tratamiento se describieron anteriormente en la sección de composiciones farmacéuticas. Los segundos agentes farmacéuticos particularmente referidos para uso en combinación con un anticuerpo de la invención son analgésicos opioides. Otros segundos agentes farmacéuticos preferidos para uso en combinación con un anticuerpo de la invención son inhibidores de TrkA (*por ejemplo*, inhibidores de TrKA extracelulares o inhibidores de TrKA intracelulares, como se describe con detalle en la sección de composiciones farmacéuticas) e inhibidores de la Proteína Cinasa C (PKC).

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un método para atenuar o inhibir una enfermedad o afección relacionada con el factor de crecimiento nervioso (NGF) en un sujeto de modo que se evita un efecto de rebote en el sujeto, el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-NGF de la invención, tal como un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende una mutación (preferiblemente una mutación de la región de bisagra) y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación

terminal en un mono cynomolgus de al menos 15 días. En otra modalidad, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 22 días (o en un intervalo de 15-22 días), o en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 15-28 días), o en un intervalo de aproximadamente 21 días a aproximadamente 28 días (o en un intervalo de 21-28 días). En otra modalidad, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en una rata de al menos 8 días. En todavía otra modalidad, el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días (o al menos 10 días, al menos 15 días, al menos 20 días, al menos 25 días, al menos 30 días, al menos 40 días, o en un intervalo de aproximadamente 10 días a aproximadamente 40 días o en un intervalo de 10-40 días o en un intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 días o en un intervalo de 15-30 días). Las mutaciones preferidas incluyen aquellas descritas con detalle anteriormente. Los anticuerpos preferidos incluyen anticuerpos anti-NGF de las secuencias y/o que tienen las propiedades funcionales descritas con detalle en la presente anteriormente. Los ejemplos no limitativos de las enfermedades o condiciones relacionadas con NGF incluyen aquellas descritas con detalle en la presente anteriormente. La invención también

proporciona el uso de un anticuerpo anti-NGF de la invención para la manufactura de un medicamento para el uso en la atenuación o inhibición de una enfermedad o afección relacionada con NGF en un sujeto de tal manera que se evita un efecto de rebote en el sujeto (*por ejemplo*, el anticuerpo se administra a una dosis y a una frecuencia de tal manera que se evita un efecto de rebote en el sujeto).

VI. Artículos de Manufactura

También dentro del alcance de la presente invención están los kits que comprenden anticuerpos de la invención que opcionalmente incluyen instrucciones para uso en el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con NGF. Los kits pueden incluir una etiqueta que indica el uso pretendido de los contenidos del kit. El término etiqueta incluye cualquier escritura, materiales de mercadeo o material de registro suministrado en o con el kit, o que de otra forma acompañe el kit..

Por ejemplo, la invención también proporciona una composición farmacéutica envasada en donde el anticuerpo PG110 (que tiene una cadena pesada como se muestra en SEC ID NO:13 y que tiene una cadena ligera como se muestra en SEC ID NO: 16), o formas derivadas, como se describe en la presente, se envasan dentro de un kit o un artículo de manufactura. El kit o artículo de manufactura de la invención contiene

materiales útiles para el tratamiento, incluyendo prevención, tratamiento y/o diagnóstico de una enfermedad o afección relacionada con NGF en un sujeto. En modalidades preferidas, la enfermedad o afección relacionada con NGF es dolor inflamatorio (particularmente dolor osteoartrítico o por artritis reumatoide), dolor musculoesquelético (particularmente dolor lumbar crónico), dolor neuropático (particularmente dolor neuropático diabético), dolor por cáncer (particularmente dolor de metástasis ósea), dolor asociado con endometriosis y/o fibromas uterinos, y dolor post-operatorio. El kit o artículo de manufactura comprende un contenedor y una etiqueta o inserto del envase o material impreso en o asociado con el contenedor que proporciona información con respecto al uso del anticuerpo PG110, para el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con NGF descrita en la presente.

Un kit o un artículo de manufactura se refiere a un producto envasado que comprende componentes con los cuales se administra un anticuerpo PG110 para el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con NGF. El kit preferiblemente comprende una caja o contenedor que aloja los componentes del kit, y también puede incluir un protocolo para administrar el anticuerpo PG110 y/o un "inserto de envase". La caja o contenedor aloja los componentes de la invención que están contenidos preferiblemente dentro de

recipientes de plástico, polietileno, polipropileno, etileno, o propileno. Por ejemplo, los contenedores adecuados para el anticuerpo PG110, incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, plumas, etc.

El término "inserto de envase" se usa para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias relacionadas con el uso de tales productos terapéuticos. En una modalidad, el inserto de envase de la invención informa a un lector, incluyendo un sujeto, por ejemplo, un comprador, quien se administrará el PG110 para el tratamiento, que el anticuerpo PG110 está indicado para el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con NGF como se describe en la presente. En una modalidad, el inserto de envase describe ciertos beneficios terapéuticos del anticuerpo PG110, incluyendo el alivio del dolor. En otra modalidad, el inserto de envase puede incluir una descripción de la dosis del anticuerpo PG110. En otra modalidad, el inserto de envase puede incluir una descripción de la vía y frecuencia de administración del anticuerpo PG110. En otra modalidad, el inserto de envase de la invención también puede proporcionar información a sujetos quienes estarán recibiendo el anticuerpo PG110 con respecto a la combinación de usos para

propósitos de seguridad y eficacia. Por ejemplo, en ciertas modalidades el kit además comprende una segunda composición farmacéutica que comprende un envasado terapéutico adicional con o co-promovido con instrucciones para la administración de ambos agentes para el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con NGF. Las enfermedades y condiciones particularmente preferidas para el tratamiento que usa los kits de la invención, incluyen dolor inflamatorio (particularmente dolor por osteoartritis o por artritis reumatoide), dolor musculoesquelético (particularmente dolor lumbar crónico), dolor neuropático (particularmente neuropatía diabética), dolor por cáncer y dolor de metástasis ósea, dolor asociado con endometriosis y/o fibromas uterinos, y dolor post-operatorio.

Otras modalidades de la presente invención se describen en los siguientes Ejemplos.

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos que no se deben considerar como limitativos. Los contenidos de los Listados de Secuencias, figuras y todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas en toda esta solicitud se incorporan expresamente en la presente como referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de un Anticuerpo Anti-NGF, PG110,

con una Región de Bisagra de IgG4 Mutada

En este ejemplo, se crea una forma mutada de un anticuerpo anti-NGF humanizado introduciendo una mutación de Serina a Prolina en la región de bisagra de la región constante de IgG4.

Se utilizan la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-NGF humanizado alfaD11. El anticuerpo alfaD11 humanizado se describe con más detalle en las Publicaciones de PCT WO 2005/061540 y WO 2006/131951. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de alfaD11 (Hu-alfaD11 V_H) se muestra en la SEC ID NO:1. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de alfaD11 (Hu-alfaD11 V_L) se muestra en SEC ID NO:2. Las regiones CDR1, 2 y 3 de Hu-alfaD11 V_H se muestran en SEC ID Nos: 3, 4 y 5, respectivamente. Las regiones CDR1, 2 y 3 de Hu-alfaD11 V_L se muestran en SEC ID Nos: 6, 7 y 8, respectivamente.

La secuencia de ácido nucleico que codifica Hu-alfaD11 V_H se enlaza al extremo 3' a la región constante de IgG4-Pro de Lonza Biologic (que codifica una mutación que altera el residuo de aminoácidos 108 de la secuencia constante de una serina a una prolina). Una secuencia de señal derivada de IgG1 de murina se introduce en el extremo 5' para producir la secuencia de ADNc de cadena pesada de Hu-alfaD11 completa. La secuencia de aminoácidos de la región

constante de IgG4 humana de tipo silvestre es conocida en la SEC ID NO:9, mientras que la secuencia de aminoácidos de la región constante de IgG4 humana mutada se muestra en SEC ID NO: 10. Dentro de las SEC ID Nos: 9 y 10, el aminoácido que es mutado de serina (en SEC ID NO:9) a prolina (SEC ID NO: 10) se localiza en la posición 108 de aminoácidos.

La secuencia de ácido nucleico que codifica Hu-alfaD11 V_L se enlaza al extremo 3' a la región constante de kappa humana (suministrada por Lonza Biologic) y una secuencia de señal derivada de IgG1 murina introducida en el 5' para codificar una región variable de cadena ligera de longitud completa.

Puesto que el anticuerpo será expresado en el Ovario de Hámster Chino (células CHO) se realiza la optimización del codon (Geneart: usando el software GeneOptimizer™) que involucra la adaptación de las secuencias de anticuerpo a la preferencia codónica de genes *Cricetulus griseus* (hámster chino). Adicionalmente, las regiones de muy alto (>80%) o muy bajo (<30%) contenido de GC se evitan en lo posible. Durante el proceso de optimización, se evitan las siguientes porciones de secuencia de actuación *cis*: cajas TATA internas, sitios chi y sitios de entrada ribosomales; tramos de secuencia rica en GC o rica en AT; elementos de secuencia ARE, INS, CRS (involucrados en la replicación del vector en bacterias); secuencias de repetición y estructuras

de secundarias de ARN; sitios aceptores y donador de empalme (críptico) y puntos de ramificación; sitios de enzima de restricción interna específicos (*Eco* RI, *Hind* III, *Pvu* I y *Not* T). La optimización de la secuencia genética del anticuerpo, incluyendo la optimización de codones, y expresión de genes de anticuerpo en células CHO se describe con más detalle en la Solicitud de PCT WO 2006/122822, propiedad de Lonza Biologics PLC.

Las secuencias de regiones variables de cadena pesada y ligera optimizadas (incluyendo las secuencias de señal) se clonan en los vectores de GS pEE6.4 y pEE12.4, respectivamente (suministrados por Lonza Biologics) para generar dos vectores de genes únicos (SGVs). Después, un vector de doble gen (DGV) es construido ligando el casete de expresión completo del vector de cadena pesada en el vector de cadena ligera, para crear un vector único que expresa tanto los genes de cadena ligera como pesada completa, así como también el gen de GS (glutamina sintetasa).

El anticuerpo mutante resultante es referido como PG110. La secuencia de nucleótido de la cadena pesada de PG110 completo (incluyendo la secuencia de señal, región variable y región constante de IgG4 mutada) se muestra en SEC ID NO: 11. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PG110 completa (incluyendo la secuencia de señal, región variable y región constante de IgG4 mutada) se muestra en SEC

ID NO: 12, donde los residuos de aminoácidos 1-19 constituyen la secuencia de señal y los aminoácidos 20-141 constituyen la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de PG110 madura, sin la secuencia de señal (incluyendo la región variable y región constante de IgG4 mutada) se muestra en SEC ID NO: 13.

La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de PG110 completa (incluyendo la secuencia de señal, región variable y región constante de kappa) se muestra en SEC ID NO: 14. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PG110 completa (incluyendo la secuencia de señal, región variable y región constante de kappa) se muestra en SEC ID NO: 15, en donde los residuos de aminoácido 1-20 constituyen la secuencia de señales y los aminoácidos 21-127 constituyen la región variable. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de PG110 madura, sin secuencia de señal (incluyendo la región variable y región constante de kappa) se muestra en SEC ID NO: 16.

Para verificar la expresión del anticuerpo PG110, el DGV que codifica las cadenas pesadas y ligeras de PG110 es transfectado temporalmente en células CHOKISV (suministradas por Lonza Biologics). Las células (0.125 x 10^6 células viables por cavidad) son plantadas en placas de 24 cavidades en un medio basado en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y L-glutamina 6 mM, e incubadas durante la noche a

37°C (10% de incubador CO_2). Previo a la transfección, el medio de siembra es remplazado con 800 µl de medio fresco y las células son incubadas por 1 hora a 37°C.

Para cada transfección, 5 µg del PG110 DVG se vuelven a suspender en 100 µl del medio de transfección (OptiMEM, Invitrogen). Un vector que codifica otro anticuerpo IgG4/kappa es utilizado como un control positivo y el amortiguador solamente se utiliza como un control negativo. Para cada transfección, 5 µl del reactivo Lipofectamina-2000 (Invitrogen) se diluyen en 100 µl del medio de transfección. Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, el reactivo de Lipofectamina diluida y ADN se combinan, mezclan y dejan reposar a temperatura ambiente por 20 minutos. Esta mezcla de 205 µl se adiciona entonces a una cavidad de la placa de 24 cavidades que contiene células. Las células se incuban por 68-72 horas a 37°C. El sobrenadante de cultivo se colecta y clarifica por centrifugación previo al ensayo por la presencia del anticuerpo.

El medio de las células transfectadas se ensaya usando un método de ELISA estándar para IgG reunida. Esto involucra la captura de las muestras y estándares en una placa de 96 cavidades revestida con un IgG Fc antihumano. El analito unido fue revelado con un anticuerpo de cadena kappa antihumana enlazado a la peroxidasa de rábano picante y la

tetra metilbencidina de sustrato cromogénico. El desarrollo del color es proporcional a la cantidad de anticuerpo reunido presente en la muestra. Las muestras estándar son preparadas de una existencia comercialmente obtenida del anticuerpo IgG4/kappa. Los resultados muestran que el DGV que codifica las cadenas ligeras y pesadas de PG110 es capaz de expresar el anticuerpo reunido.

Ejemplo 2: Características de Enlace del Anticuerpo Anti-NGF Mutado PG110

En este ejemplo, se examina la especificidad de enlace y cinética de enlace de PG110, el anticuerpo anti-NGF mutado preparado como se describe en el Ejemplo 1.

A. Especificidad de Enlace

El perfil de selectividad de PG110 que enlaza a neurotrofinas humanas se determina usando un ensayo de enlace Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a una Enzima (ELISA). Las placas de ELISA se revisten con 100 ng/cavidad de ya sea NGF humano (R&D Systems, Cat. No. 256-GF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (R&D Systems, Cat. No. 248-BD), neurotrofina 3 (NT3) ((R&D Systems, Cat. No. 267-N3) o neurotrofina 4 (NT4) (R&D Systems, Cat. No. 268-N4). PG110 se agrega a cavidades revestidas con neurotrofina en el intervalo de concentración de 3 pM - 3 nM. Después del lavado

(PBS en 0.5% (v/v) Tween 20, pH 7.3), el enlace de PG110 se detecta usando un anticuerpo de IgG antihumano biotinilado (Rockland Immunochemical Inc., Cat. No. 609-1602) acoplado con fosfatasa alcalina enlazada a estreptavidina (Sigma Aldrich, Cat. No. S2890), seguido por el desarrollo de una reacción de color por la adición de fosfato de 4-metilumbeliferilo (Sigma Aldrich, Cat. No. M3168). El producto de reacción es cuantificado usando un fluorímetro (excitación a 360nm; emisión a 440 nm).

Los resultados se resumen en la gráfica de la Figura 1. PG110 unido a las cavidades revestidas con NGF humana de una manera dependiente de la concentración, con una concentración de enlace media máxima de 726 pM (derivada de determinaciones por triplicado en una placa de ensayo única). En contraste, PG110 no muestra el enlace medible para cavidades de ensayo revestidas con BDNF, NT3, o NT4 humana, que fueron detectables de otra forma usando anticuerpos de control positivo específicos para estas neurotrofinas. Estos resultados demuestran que PG110, cuando es probado a concentraciones de hasta 3 nM *in vitro*, específicamente enlaza a NGF humano y exhibe reactividad no cruzada para neurotrofinas relacionadas.

B. Cinética de Enlace.

El análisis BIAcore es utilizado para evaluar la

cinética de enlace de la interacción entre PG110 y ya sea NGF humano recombinante (rhNGF) o NGF de rata recombinante (rrNGF).

El factor de crecimiento nervioso beta humano recombinante (rhNGF) (R&D Systems, Cat. No. 256 GF/CF) o factor de crecimiento nervioso beta de rata recombinante (rrNGF) (R&D Systems, Cat. No. 556 GF/CF) es inmovilizado covalentemente en chips sensores de CM5 (GE Healthcare, anteriormente Biacore AB, Uppsala, Suecia) vía grupos amina primaria usando el kit de unión de amina (GE Healthcare), con HBSEP (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES) 10 mM, NaCl 150 mM, ácido etilen-diamin-tetraacético (EDTA) 3 mM y 0.005% de Tween® 20, pH 7.4) como amortiguador de corrida. La superficie del chip sensor es activada por inyección de una mezcla de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) 400 mM y N-hidroxisuccinimida (NHS) 100 mM (1:1, v/v) por 7 minutos a una velocidad de flujo de 10 µl/min. β-NGF (rg o rr) es diluida a 200 ng/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 4.0 y la solución diluida es inyectada sobre la superficie activada por varias ocasiones para producir diferentes densidades de la superficie. Para el análisis de interacción cuantitativa, se prepara una densidad de superficie de 60 RU por inyección de 50 µl de β-NGF diluida (tiempo de contacto 5 minutos). Los ésteres de NHS no

reaccionados se desactivaron con 70 µl (tiempo de contacto 7 minutos) de solución de etanolamina (1 M, pH 8.5).

Los parámetros para los experimentos realizados con NGF inmovilizado son como sigue: amortiguador de corrida: HBSEP que contiene 100 µg/ml de albúmina de suero bovino; velocidad de flujo: 25 µl/min; temperatura: 37°C; densidad de ligando: 60RU/60 RU (para rhNGF/rrNGF); analito: concentraciones de PG110: 2nM, 4nM, 8nM, 17nM, 33nM, y 66nM en amortiguador de corrida; tiempo de contacto: 240 segundos; tiempo de disociación: 600 segundos; regeneración: 2 x 1 min. glicina 10 mM, pH 1.5.

Los datos y evaluaciones cinéticas se dan con el software GraphPad Prism (versión 5.01, Graphpad Software Inc., San Diego, CA) y el software BIAevaluation (versión 4.0.1, GE Healtcare), datos de ajuste para el modelo de enlace Langmuir 1:1.

Los resultados se resumen posteriormente en la Tabla 1 (en donde K_{ass} indica la constante de velocidad de asociación, K_{diss} indica la constante de velocidad de disociación y K_D indica la constante de disociación de equilibrio). Los datos indican media ± (sem) de 3 determinaciones separadas.

Tabla 1: Constantes cinéticas de la Interacción de PG110 con

NGF Inmovilizado

Analito	ligando	K_{ass} ($1\ mol^{-1}\ s^{-1}$)	K_{diss} (s^{-1})	K_D
PG110	rh NGF	$1.6 \times 10^5 \pm 3.5 \times 10^3$	$1.2 \times 10^{-5} \pm 3.0 \times 10^{-6}$	72 ± 2 pM
PG110	rr NGF	$1.7 \times 10^5 \pm 2.0 \times 10^3$	$1.5 \times 10^{-5} \pm 5.6 \times 10^{-6}$	92 ± 34 pM

Los resultados del estudio muestran que las interacciones de PG110 con NGF se caracterizan por el enlace de alta afinidad y que podría detectarse una diferencia no significativa en la afinidad (K_D) para cualquier especie homologa (humana contra rata).

Un análisis adicional de la cinética de enlace se realiza usando material de PG110 Fab generado por fragmentación de PG110 en Papaína - Sefarosa (Thermo Scientific). La inmovilización de rhNGF se realiza usando HBSEP como amortiguador de corrida a 25°C. Las superficies del chip sensor se activan por inyección de una mezcla de EDC 200 mM y NHS 50 mM (1:1, v/v) por 7 minutos a una velocidad de flujo de 10 µl/min. Se diluye rhNGF a 500 ng/ml en acetato de sodio 10 mM pH 4.0 y 20 µl (tiempo de contacto 2 minutos) de la solución diluida se inyectan en las superficies activadas de cada una de las tres células para producir niveles de inmovilización de 93.1, 100.3 y 88.7 RU. Los ésteres de NHS sin reaccionar se desactivan con 70 µl (tiempo de contacto 7 minutos) de etanolamina (1 M, pH 8.5).

Una serie de concentraciones de PG110 Fab (0.39,

0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5 y 25 nM), en 250 µl, se pasaron sobre superficies de rhNGF recientemente inmovilizado a una velocidad de flujo de 50 µl/min, 37°C en un amortiguador de corrida de HPSEP que contiene 100 µg/ml de albúmina de suero bovino. La disociación se monitorea por 30 minutos, y después la regeneración completa del análisis de interacción se alcanza con un impulso (30 µl) de glicina 10 mM, pH 1.5. Adicionalmente, para definir la K_{diss} muy lenta de forma más precisa, la disociación de una alta concentración (100 nM) de PG110 Fab se monitorea por 8 horas en cada superficie de rhNGF y se usa para la cuantificación de la constante de velocidad de disociación (K_{diss}). Los datos se ajustan de manera global por un modelo de enlace Langmuir 1:1 usando una K_{diss} fija, determinada de la medición de disociación extendida. Para evaluar la reproducibilidad de los análisis de constantes cinéticas se realizan por triplicado en las tres superficies recientemente inmovilizadas. Las constantes de cinética calculadas se resumen en la Tabla 2.

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

Analito	Nivel de Inmovilización	K_{ass} ($l\ mol^{-1}\ s^{-1}$)	K_{diss} (s^{-1})	K_D
PG110 Fab	93.1	3.6×10^5	1.1×10^{-5}	31.3 pM
	100.3	3.6×10^5	1.2×10^{-5}	32.7 pM
	88.7	4.4×10^5	1.2×10^{-5}	27.8 pM
Media		$3.8 \times 10^5 \pm 0.5 \times 10^5$	$1.1 \times 10^{-5} \pm 0.06 \times 10^{-5}$	30.6 ± 0.25 pM

Ejemplo 3: Características funcionales del Anticuerpo Anti-NGF Mutado PG110

En este ejemplo, varias propiedades funcionales de PG110, el anticuerpo anti-NGF mutado preparado como se describe en el Ejemplo 1, son examinadas en ensayo *in vitro*.

A. Inhibición del Enlace de NGF a Receptores de TrkA y $p75^{NTR}$

Los estudios de enlace de radioligando se conducen para comparar el efecto inhibidor de PG110 en el enlace de NGF a receptores de $p75^{NTR}$ y TrkA humanos. Las células HEK293 que expresan cualesquiera receptores de $p75^{NTR}$ y TrkA humanos de longitud completa se incuban con ^{125}I-NGF 2 nM en la presencia de PG110 a una concentración final de 0.01 - 100 nM. El NGF no etiquetado (que varía en concentración de 0-1

µM) también se incluye en las reacciones. Las reacciones se realizan en tubos desechables de fondo plano PT1276 de paredes altas (Thermo Life Sciences). Primero, el NGF radioetiquetado, NGF no etiquetado y el anticuerpo PG110 se combinan e incuban en los tubos por 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación, en amortiguador de enlace (1 x PBS, CaCl 0.9 mM, MgCl 0.5 mM, 0.1% BSA Fracción V, 0.1% (p/v) glucosa). Luego, se agregan 200 µl de células preparadas (diluidas a 5 x 10^5 células/ml). Después de unos 30 minutos adicionales de incubación a temperatura ambiente con agitación vigorosa, cada reacción se divide a través de tres tubos de plástico (Microtubo PE de 0.4 ml, Sarstedt 72.700) con 100 µl de la reacción siendo agregados a cada tubo. Cada microtubo ya contenía 200 µl de sucrosa 150 mM en amortiguador de enlace. Estos tubos luego se centrifugan a 20,000 x g a 4°C por 3 segundos para formar en pelotillas las células. La sucrosa proporciona un gradiente de densidad el cual actúa para secuestrar cualquier NGF radioetiquetado desplazado. Los tubos luego se congelan en un baño de hielo seco/etanol. Las puntas de estos tubos congelados luego se remueven en tubos de plástico separado (Naiad Ltd) para el conteo usando un contador mini-gamma LKB Wallac para cuantificar el ^{125}I-NGF unido a las células.

Los resultados se ilustran en las gráficas de las Figuras 2A y 2B, en las cuales el efecto de PG110 en el

enlace de NGF a TrkA se muestra en la Figura 2A y el efecto de PG110 en el enlace de NGF a $p75^{NTR}$ se muestra en la Figura 2B. PG110 inhibió el enlace de ^{125}-NGF a los receptores de TrkA o $p75^{NTR}$ en una manera dependiente de la concentración, con valores IC_{50} medios geométricos (95% CI) de 170 (88-331) pM y 206 (86 - 491) pM, respectivamente (ambos n=3). Un anticuerpo de control de isotipo no inhibe el enlace de ^{125}I-NGF a cualquier receptor. Estos resultados demuestran que PG110 potencialmente bloquea la interacción de enlace de NGF humano con ambos de sus receptores *in vitro*.

B. Ensayo de Proliferación de Célula TF-1

TF-1 es una línea celular eritroleucémica humana que expresa TrkA humana y prolifera en respuesta al NGF. En estos experimentos, las células TF-1 se cultivan en la presencia de 10 ng/mL de NGF recombinante humano, de rata, o de ratón, con concentraciones incrementadas de anticuerpo PG110, y la proliferación celular se cuantifica 40 horas más tarde usando un método colorimétrico basado en la reducción metabólica de la sal de tetrazolio amarillo MTT [bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrasódico] a formazan púrpura.

Antes del uso en el ensayo, las células TF-1 se cultivan por 1 semana en RPMI-1640 que contiene 10% suero bovino fetal (FBS) con 2 ng/ml de GM-CSF (R&D Systems, Cat.

No. 215-GM-50). Las células se lavan, se resuspenden en RPMI-1640 + 10% FBS a una concentración de 300,000 células/ml y se vuelven a colocar en placas en microplacas de 96 cavidades (15,000 células/cavidad en 50 µl). Al menos 60 minutos después de la adición a las placas de ensayo de 96 cavidades, las células se exponen a NGF recombinante ya sea humano, de rata o de ratón (10 ng/ml) en RPMI-1640 que contiene 10% FPB (50 µl/cavidad) que contiene anticuerpo PG110. El medio que contiene NGF y anticuerpo de prueba se prepara a la concentración de ensayo final 2X al menos 30 minutos antes que se agregue a las células pre-sembradas. El anticuerpo de prueba se somete a ensayo en el intervalo de concentración de 0.6 ng/ml a 24 µg/ml. Las cavidades de control se incluyen, conteniendo ya sea medio solo o conteniendo células TF-1 en la ausencia de NGF ("solución testigo celular"). Cada tratamiento se realiza por triplicado. Después de un período de incubación de 40 horas (37°C, 5% CO_2), la proliferación se cuantifica usando un kit de proliferación de célula MTT (ATCC Cat. No. 30-1010K). Se agregan 10 µl de reactivo MTT antes de la incubación por unas 4 horas adicionales a 37°C. Las cavidades luego se incuban subsecuentemente con Reactivo Detergente (100 µl/cavidad; mezclado suave) para incubación durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. Después, la absorbancia se registra a 570 nm. Los valores de OD promedio finales para las mediciones por triplicado se

calculan por sustracción del valor promedio para la solución testigo celular.

La incubación de células TF-1 con NGF en la presencia de PG110 (0.6 ng/mL-24 µg/mL) resulta en una inhibición relacionada con la concentración de proliferación celular. Los resultados se ilustran en las gráficas de las Figuras 3A-3C, en donde la Figura 3A muestra el efecto del tratamiento con PG110 en la proliferación de células TF-1 estimulada por NGF humano, la Figura 3B muestra el efecto del tratamiento con PG110 en la proliferación de células TF-1 estimulada por NGF de rata y la Figura 3C muestra el efecto del tratamiento con PG110 en la proliferación de células TF-1 estimulada por NGF de ratón. PG110 demuestra potencias inhibitorias similares para todos los homólogos de NGF probados y los valores IC_{50} son aproximadamente 30 ng/mL. Los valores IC_{50} se resumen posteriormente en la Tabla 3 (los valores IC_{50} se expresan como ng/ml):

Tabla 3: Resumen de Valores IC_{50} para PG110 en el Ensayo de Proliferación de Células TF-1

NGF Recombinante Humano			NGF Recombinante de Rata			NGF Recombinante de Ratón		
Media Geom.	95% CI	n	Media Geom.	95% CI	n	Media Geom.	95% CI	n
29.4	26.5 - 32.7	5	27.8	24.5 - 31.6	5	30.8	27.4 - 34.5	3

Los ensayos de proliferación de células TF-1 demuestran que PG110 equipotentemente neutraliza la activación de receptores de TrkA humana por NGF humano o de roedor.

C. Inhibición de Supervivencia de Ganglio de Raíz Dorsal de Pollo

Para probar la capacidad de PG110 para inhibir el efecto de NGF en neuronas sensoriales, se usa un ensayo *in vitro* usando cultivos primarios de células de ganglio de raíz dorsal (DRG) obtenidas de embriones de pollo de 8 días. Bajo estas condiciones, la supervivencia de DRGs de pollo es dependiente de la presencia de NGF exógeno agregado al medio de cultivo.

Los ganglios de raíz dorsal se aíslan de embriones de pollo de 8 días y se colectan en un tubo Falcon de 50 ml, el número total de ganglios colectados es aproximadamente 400, lo cual aproximadamente corresponde a 20 embriones. Los ganglios son subsecuentemente tratados con tripsina por 5 minutos a 37°C (Tripsina-EDTA Euroclone, EB3052D) y disociados con una jeringa de 10 ml (aguja "amarilla" 20G) 4-5 veces antes de ser centrifugados por 3 minutos a 800 rpm.

Después de la remoción cuidadosa del medio que contiene tripsina, las células se resuspenden en 10 ml de

medio fresco (mezcla de nutriente de Ham F-12 + Glutamax I), seguido por una repetición del procedimiento de disociación, y el volumen del medio se ajusta para una concentración de siembra de 100,000-400,000 células/ml. Las células se siembran en la ausencia de tratamientos en la mitad del volumen final que contiene 20% suero de caballo (Euroclone ECS0091L), usando placas de 24 multi-cavidades (Falcon 353047) que se han revestido con poli-L-lisina (100x = 1 mg/ml de solución de bromhidrato de poli-L-lisina; Sigma P2636) disuelta en agua destilada (30 minutos bajo UV, seguido por 30 minutos de secado bajo campana estéril).

Mientras las células se adhieren a las placas (30 minutos en incubador con 5% CO_2, 37°C), las soluciones ya sea de NGF o NGF/anticuerpo anti-NGF se preparan a concentración 2X en la mitad del volumen final y se agregan cavidad por cavidad para alcanzar la concentración final correcta (es decir, % final de suero de caballo = 10%; concentración final de NGF = 5 ng/ml). Las células de control se incluyen, conteniendo células DRG en la ausencia de NGF. Cada condición se prueba por duplicado. Después de la adición ya sea de NGF o mezclas de NGF/anti-NGF, las placas se regresan al incubador (5% CO_2, 37°C). El número de células se registra 48 horas más tarde, contando todas las células DRG observadas a lo largo del diámetro vertical de cada cavidad (microscopio Nikon TMS, ampliación 10X). Solamente las células DRG se

incluyen en los conteos, las cuales son fácilmente identificables de acuerdo con sus características morfológicas, es decir, células que reflejan la luz, brillantes, redondas con neuritas largas.

La potencia de neutralización de NGF del anticuerpo PG110 probada en el intervalo de concentración de 10 ng/ml a 25 µg/ml para la neutralización ya sea de NGF humano recombinante (rhNGF), NGF de rata recombinante (rrNGF) o NGF de ratón recombinante (rmNGF). En estos experimentos, 100% de inhibición de supervivencia es equivalente al número de células contadas cuando las células se cultivan sin NGF, en la ausencia de anticuerpo anti-NGF. A la inversa, el 0% de inhibición es equivalente al número de células contadas cuando las células se exponen a 5 ng/ml de la isoforma de NGF relevante, en la ausencia de anticuerpo anti-NGF.

La incubación de células en la presencia de PG110 (10 ng/mL - 25 µg/ml) resulta en una reducción dependiente de la concentración en la supervivencia de células, con una IC_{50} entre 10 y 50 ng/mL, para todas las especies de homólogos de NGF (n = 1). Estos datos demuestran que PG110 inhibe la actividad del NGF en neuronas sensoriales.

D. Inhibición de Excrecencia de Neurita de Células PC12

PC12 es una línea celular de faeocromocitoma de

rata (tumo derivado de célula cromafina) que expresa tanto receptores de p75NTR como TrkA de rata. Cuando se cultivan en placas revestidas con colágeno en la presencia de NGF, las células PC12 se diferencian en neuronas tipo simpatéticas, que llegan a ser de excrecencias extendidas y planas (neuritas). La inhibición de la excrecencia de neurita mediada por NGF se emplea como una medida *in vitro* semi-cuantitativa de la capacidad de PG110 para inhibir la interacción de NGF con los receptores de p75NTR y TrkA de rata.

Las células PC12 (ECAAC 88022401) son cebadas (es decir, pre-expuestas de NGF) lavando 100,000 células con medio libre de suero (RPMI-1640 con Glutamax I, Gibco-Invitrogen 61870) y volviendo a colocar en placas en matraces de cultivo de plástico tratados con colágeno (colágeno Tipo I, BD 35-4236, se emplea como una solución de trabajo de 0.5 mg/ml) en RPMI-1640 con Glutamax-I que contiene 10% FBS y NGF de rata recombinante (R&D Systems, Cat. No. 556-NG-100) (100 ng/ml). Antes de la siembra, las células se pasan suavemente al menos 5 veces a través de una aguja 21G para desagregar los grumos de células. El medio que contiene NGF se remueve y cambia dos veces durante el período de cebado de 1 semana.

Al final de este período, las células PC12 cebadas se lavan con medio libre de suero y se tratan con tripsina (Tripsina-EDTA Euroclone, ECB3052D) por 2-3 minutos en un

incubador humidificado (5% CO_2, 37°C). La tripsina se bloquea por adición de medio que contiene suero y las células se centrifugan, se lavan con medio libre de suero y se resuspenden en RPMI-1640 con Glutamax-I que contiene 10% FBS. Las células se pasan suavemente al menos 5 veces a través de una aguja 21G para desagregar los grumos de células antes de ser colocadas de nuevo en placas en placas de Petri tratadas con colágeno a una densidad de 50,000 células/ml. Tres placas por condición de ensayo se preparan. Para la prueba de anticuerpo, una mezcla de incubación 2X (NGF de rata recombinante + anti-NGF) se prepara 1 hora antes de la adición a las células pre-sembradas. La concentración final de NGF es 20 ng/ml, mientras que el anticuerpo anti-NGF se prueba en cuatro diluciones: 20 µg/ml, 2 µg/ml, 200 ng/ml y 20 ng/ml.

La excrecencia de neurita inducida por NGF se registra después de 72 horas. En este tiempo, el medio se remueve y las células se lavan con PBS libre de calcio y magnesio (GIBCO, 10010) y se fijan por 30 minutos con 4% formaldehído en PBS. Las imágenes de microscopio (ampliación 20X) se adquieren usando un microscopio Nikon Eclipse TE2000-E y Software Leica IM1000 Image Manager. La inhibición de excrecencia de neurita se evalúa y los registros (++; +/-; --) se atribuyen con base en el número de células que exhiben un fenotipo no diferenciado (= ausencia de neuritas

claramente definidas).

La incubación de células en la presencia de PG110 (20 ng/mL - 20 µg/mL) inhibe la excrecencia de neurita mediada por NGF, con inhibición total evidente a 200 ng/mL, resaltando que PG110 es un inhibidor selectivo de la interacción entre NGF de rata recombinante y sus receptores de neurotrofina de rata nativa.

Ejemplo 4: Estabilidad *In Vivo* de Anticuerpo Anti-NGF Mutado PG110

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

A. Estudios en Rata

A las ratas Sprague-Dawley se les administra una infusión intravenosa (IV) por 10 minutos del anticuerpo PG110 a una dosificación de 3 mg/kg, 30 mg/kg o 100 mg/kg en los Días de Estudio 1 y 56. La evaluación de datos toxicocinéticos se realiza usando concentración en suero media y puntos temporales de 6 animales/punto temporal en cada grupo. Los tiempos de colección de sangre nominales son: pre-dosis y 0.25, 1, 3, 6 y 24 horas post-dosis en el Día de Estudio 1 y 56 y también a 48, 96, 168, 336, 504, 672, 840, 1008 y 1176 horas post-dosis en el Día de Estudio 1. El

bioanálisis de muestra de suero se realiza por Alta Analytical Laboratory usando un método de ELISA validado. El análisis de datos farmacocinéticos se realiza usando SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System 2.0 con software WinNonlin Professional versión 4.0 (Pharsight Corp.).

Después de la administración IV, los valores T_{max} (el tiempo a la máxima concentración en suero) varían desde 0.25 a 1 horas, los primeros dos puntos temporales de colección de muestra. Todos los animales exhiben disposición bifásica con semividas de eliminación terminal de aproximadamente 8 a 9 días. Más específicamente, la $T_{1/2}$, en horas, para los tres grupos de tratamiento se resume posteriormente en la Tabla 4:

Tabla 4: Semivida de Eliminación Terminal de PG110 en Ratas Sparague-Dawley

Nivel de Dosis (mg/kg)	Semivida de Eliminación Terminal (horas)
3	217
30	192
100	207

Por consiguiente, los valores de semivida media de grupo varían de 192-217 horas (8-9 días) en las ratas.

B. Primer Estudio en Monos

A los monos cynomolgus se les administra una

infusión intravenosa (IV) única, aproximadamente 30 minutos, de anticuerpo PG110 a una dosificación de 3 mg/kg, 30 mg/kg o 100 mg/kg. Los animales se dividen en machos y hembras; cada dosis se prueba en 2 machos y 2 hembras (excepto solamente 1 hembra se prueba a 30 mg/kg). Los tiempos de colección de sangre nominales para el análisis de datos toxicocinéticos son: inmediatamente post-dosis (dentro de 2 minutos del final de la infusión), 0.25, 1, 3, 6, 24, 48, 96, 168, 336, 504, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512 y 1680 horas post-final de la infusión. El bioanálisis de muestra de suero se realiza por Alta Analytical Laboratory usando un método de ELISA validado. El análisis de datos farmacocinéticos se realiza usando SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System 2.0 con software WinNonlin Professional versión 4.0 (Pharsight Corp.).

Después de la administración IV, los valores T_{max} (el tiempo a la máxima concentración en suero) medidos desde el inicio de la infusión varían desde el final de la infusión a aproximadamente 1.6 horas. Todos los animales exhiben disposición bifásica (con la excepción de una hembra tratada con 30 mg/kg, que muestra un declive abrupto después del punto temporal de 504 horas) con semividas de eliminación terminal de aproximadamente 15-22 días. Más específicamente, la $T_{1/2}$, en horas, para los seis grupos de tratamiento se resume posteriormente en la Tabla 5:

Tabla 5: Semivida de Eliminación Terminal de PG110 en Monos Cynomolgus

Nivel de Dosis (mg/kg)	Sexo	Semivida de Eliminación Terminal (horas)
3	H (n=2)	370
	M (n= 2)	531
30	H (n=1)	471
	M (n=2)	450
100	H (n=2)	383
	M (n= 2)	461

Por consiguiente, los valores de semivida media de grupo varían de 370-531 horas (15-22 días) en los monos cynomolgus. Los valores de semivida media generalmente son más largos para machos que para hembras, aunque dado el número pequeño de animales estudiados no está claro si esta es una diferencia estadísticamente significativa.

C. Segundo Estudio en Monos

A los monos cynomolgus se les administran infusiones intravenosas semanalmente de anticuerpo PG110 durante un período de cuatro semanas. Una infusión intravenosa (IV), aproximadamente 30 minutos, de anticuerpo PG110 a una dosificación de 3 mg/kg, 30 mg/kg o 100 mg/kg se administra en los días 1, 8, 15 y 22. Los animales se dividen en machos y hembras; cada dosis se prueba en 3 machos y 3 hembras. Las muestras de sangre en serie se colectan en los siguientes puntos temporales nominales: pre-dosis, inmediatamente post-dosis (dentro de 2 minutos del final de

la infusión), 0.25, 1, 3, 6, 24 y 168 horas después del final de la infusión en los días 1 y 22. Las muestras adicionales se colectan de todas las pre-dosis de animales en el día 15 y de los animales en recuperación a 336, 504, 672, 840, 1008, 1176, 1344, 1512, 1680, 1848, 2016 y 2208 horas después de la administración de la dosis final en el día 22. Las horas listadas que comienzan en 24 horas después de la infusión corresponden a los días farmacocinéticos 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84 y 92. Todos los tiempos de colección de sangre actuales se convierten para comenzar desde el inicio de la infusión.

El bioanálisis de muestra de suero para análisis de concentración de PG110 se realiza por Alta Analytical Laboratory usando un método de ELISA validado. El análisis de datos farmacocinéticos se realiza usando SNBL USA Pharmacokinetics Analysis System 2.0 con software WinNonlin Professional versión 4.0 (Pharsight Corp.).

Después de la administración IV, los valores T_{max} medios de grupo (el tiempo a la máxima concentración en suero) medidos desde el inicio de la infusión varían desde aproximadamente 0.6 horas a 2.6 horas. Todos los animales exhiben disposición bifásica, con semividas de eliminación terminal de aproximadamente 21-28 días (503 a 685 horas). Más específicamente, la $T_{1/2}$, en horas, para los seis grupos de tratamiento se resume posteriormente en la Tabla 6:

Tabla 6: Semivida de Eliminación Terminal de PG110 en Monos Cynomolgus

Nivel de Dosis (mg/kg)	Sexo	Semivida de Eliminación Terminal (horas)
3	H (n=3)	503
	M (n= 3)	564
30	H (n=3)	511
	M (n=3)	619
100	H (n=3)	532*
	M (n= 3)	685

* basado en el valor n=2

Por consiguiente, los valores de semivida media de grupo varían de aproximadamente 21-28 días en los monos cynomolgus. Los valores de semivida media generalmente son más largos para machos que para hembras, aunque dado el número pequeño de animales estudiados no está claro si esta es una diferencia estadísticamente significativa.

Ejemplo 5: Potencia de PG110 en comparación con el Anticuerpo Precursor de rata

En este ejemplo, se realizan experimentos adicionales usando el ensayo de proliferación de células TF1 (como se describe en el Ejemplo 3B, anterior) para comparar la potencia neutralizante de NGF de PG110 con su precursor, αD11 de rata. El anticuerpo αD11 de rata se suministra como dos lotes separados, uno a una concentración madre de 0.73 mg/ml y el otro a una concentración madre de 0.63 mg/ml. Los anticuerpos PG110 y αD11 de rata se evalúan en ensayos de proliferación de células TF1 mediada por NGF humano o NGF de

rata, usando el kit de proliferación de células MTT (ATCC Cat. No. 30-1010K).

Antes del uso en los ensayos, las células TF1 se cultivan por una semana en RPMI-1640 (ATCC cat. #30-2001) que contiene 10% suero bovino fetal (FBS, Cambrex DE14-801F, Lote 6SB006) con 2 ng/ml GM-CSF (R&D Systems, cat. # 215-GM-50). Las células se lavan, se resuspenden en RPMI-640 + 10% FBS a una concentración de 300,000 células/ml y se vuelven a colocar en placas en microplacas de 96 cavidades (15,000 células/cavidad, en 50 µl).

Al menos 60 minutos después de la adición a las placas de ensayo de 96 cavidades, las células se exponen ya sea a NGF recombinante humano o de ratón (10 ng/ml) en medio de cultivo (10% FBS en RPMI-1640; 50 µl/cavidad) que contiene anticuerpo anti-NGF. El medio que contiene NGF y anticuerpo de prueba se prepara a la concentración de ensayo final 2X, al menos 30 minutos antes que se agregue a las células pre-sembradas. Los anticuerpos de prueba se someten a ensayo en el intervalo de concentración de 0.6 ng/ml a 24 µg/ml. Las cavidades de control siempre se incluyen, ya sea conteniendo medio solo, o conteniendo células TF1 en la ausencia de NGF ("solución testigo celular"). Cada tratamiento se realiza por triplicado. Después de un período de incubación de 40 horas (37°C, 5% CO_2), 10 µl de reactivo MTT se agregan antes de la incubación por unas 4 horas adicionales a 37°C. Las cavidades

se incuban subsecuentemente con Reactivo Detergente (100 µl/cavidad; mezclado suave) por incubación durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. Después, la absorbancia se registra a 570 nm. Los valores de OD promedio finales para las mediciones triplicadas se calculan por sustracción de los valores promedio para la solución testigo celular. La inhibición máxima se establece correspondiente al valor de OD promedio observado para las células cultivadas sin NGF, en la ausencia de anticuerpo de prueba. La inhibición cero se establece correspondiente al valor de OD promedio observado para las células expuestas a 10 ng/ml de NGF en la ausencia de anticuerpo de prueba.

Las potencias inhibitorias de los anticuerpos de NGF se cuantifican como valores IC_{50} (*es decir*, la concentración del anticuerpo requerida para reducir la respuesta proliferativa mediada por NGF por 50%) usando sofware GraphPad Prism v5.01. Las curvas de incubación se grafican individualmente para obtener valores de IC_{50} discretos para cada anticuerpo de prueba en cada experimento. Las medidas de proliferación celular se normalizan con respecto a los máximos valores de OD obtenidos dentro de este ensayo, en la ausencia del anticuerpo de prueba agregado. Las respuestas normalizadas luego se grafican contra la concentración de anticuerpo de prueba en una escala logarítmica, y los valores IC_{50} se derivan usando la función

de ajuste de curva no lineal GraphPad Prism 'logaritmo(inhibidor) vs respuesta - inclinación variable'.

El efecto inhibitorio de PG110 en comparación con su anticuerpo precursor αD11 de rata se resume posteriormente en la Tabla 7.

Tabla 7: Resumen de Valores IC50 (ng/ml) en el Ensayo de Proliferación de Células TF1

Anticuerpo	NGF Humano			NGF de Rata		
	Media Geom.	95% CI	n	Media Geom.	95% CI	n
PG110	27.0	25.8-28.3	2	26.2	13.6-50.4	2
αD11 de Rata (Lote 1)	53.7	35.7-114	3	44.8	31.4-64.1	3
αD11 de Rata (Lote 2)	107		1	54.9	-	1

Los resultados indican que el anticuerpo PG110 tiene aproximadamente 2 veces potencia mayor en la neutralización de la actividad de NGF en comparación con su anticuerpo precursor αD11 de rata. Además, los valores de potencia obtenidos para el lote 2 de αD11 de rata sugieren que este lote puede tener una potencia menor que el material de lote 1.

Ejemplo 6: El Anticuerpo Anti-NGF PG110 No Exhibe un Efecto de Rebote en un Modelo Animal

En este ejemplo, se utiliza un modelo de lesión de

piel de rata para examinar la actividad del mAb PG110. El modelo de lesión de piel de rata se desarrolla con base en las observaciones que las ratas tratadas con anticuerpo anti-NGF desarrollar una respuesta prurítica, con un incremento dependiente de la dosis de rascadura que se observa. La lesión no está asociada con la reducción de la inervación a la epidermis. Además, las ratas exhiben rápida recuperación después de la eliminación del anticuerpo. Esta actividad de lesión de piel solamente se ha observado en roedores, que tienen un comportamiento de aseo. Aunque no se propone que sea limitado por el mecanismo, se pone en hipótesis que en las ratas tratadas con anti-NGF hay aseo continúo debido a un bucle de retroalimentación deteriorado para detener la respuesta de rascadura, lo cual resulta en lesión cutánea. A las lesiones de piel luego se les puede dar un registro cuantitativo como una medida de la actividad del anticuerpo anti-NGF en las ratas.

En varios estudios clínicos sobre la actividad de anticuerpos anti-NGF (tal como el anticuerpo humanizado RN-642, descrito adicionalmente en la Publicación de Patente de Estados Unidos No. 20040237124 y Abdiche, Y.N. *et al.* (2008) *Protein Sci.* 17:1326-1335), se ha reportado que la efectividad del anticuerpo disminuye por un período después de una dosificación (por ejemplo, días 14-21 después de la dosificación), seguido por una recuperación de la actividad

del anticuerpo. Existen reportes de dolor incrementado y/o eventos adversos incrementados (tales como sensaciones anormales, que varían de alodinia a hormigueo, picazón o sensación de alfileres y agujas) durante este período después de una dosificación en la cual la actividad del anticuerpo disminuye. Esta disminución de la actividad del anticuerpo por un período de tiempo después de una dosificación es referida en la presente como un "efecto de rebote".

Para evaluar el efecto del anticuerpo PG110 en los comportamientos de aseo y rascadura en ratas concientes, ratas Sprague-Dawley machos y hembras se tratan con mAb PG110 (0.003, 0.01, 0.03, 0.3 o 3 mg/kg), administrado como un bolo i.v., o con un control de vehículo. Las ratas reciben una dosis semanal por cuatro semanas. Los criterios de evaluación son: número de episodios de aseo y rascadura, temperatura corporal, latencia al lamido de la pata, latencia a saltar (intentos de escapar) y número y registro de severidad de lesiones de piel con el tiempo.

Los resultados indican que no se observan lesiones de piel en ratas administradas con vehículo, mientras que en los grupos de ratas administradas con PG110, las lesiones de piel se observan en todos los animales a todas las dosificaciones de anticuerpo probadas. Además, el número y severidad de lesiones de piel incrementa con el tiempo e incrementa con las dosificaciones incrementadas de

anticuerpo. El número de episodios de rascadura también se incrementa en los animales tratados con anticuerpo, pero el tratamiento con anticuerpo no tiene algún efecto en el comportamiento de aseo, temperatura corporal, latencia al lamido de la pata o latencia a saltar (intentos de escapar).

La severidad de la lesiones de piel se cuantifica usando un registro de lesión, el cual iguala el número de lesiones multiplicado por el área (en mm^2) de las lesiones. Los registros de lesión con el tiempo para tratamiento con PG110, en comparación con el vehículo, se muestran en la gráfica de la Figura 4. Los resultados muestran que las ratas tratadas con PG110 muestran un incremento estable de los registros de lesión con el tiempo, en particular a las dosis mayores probadas (0.3 mg/kg y 3 mg/kg). Es decir, el anticuerpo no exhibe un efecto de rebote significativo durante el transcurso del experimento, sugiriendo que puede ser posible seleccionar los parámetros de frecuencia de administración y dosificación para el uso en humanos de modo que se puede evitar un efecto de rebote.

Por consiguiente, en resumen, el modelo de lesión de piel en rata ilustra una ventaja del anticuerpo anti-NGF PG110 en que el anticuerpo PG110 no exhibe un efecto de rebote observable, el cual se ha reportado para otros anticuerpos anti-NGF, sugiriendo que PG110 exhibe una actividad *in vivo* más consistente y prolongada. Aunque no se

propone que sea limitado por el mecanismo, se piensa que esta capacidad del PG110 para evitar un efecto de rebote *in vivo* se relaciona con la semivida de eliminación terminal prolongada observada para este anticuerpo.

Ejemplo 7: Farmacocinética Humana de PG110

Se espera que el PG110 tenga una semivida en humanos de aproximadamente 10-30 días (intervalo 10 a 40 días) con una disposición multifásica. Con base en el valor C_{min} objetivo de ~0.25 µg/ml (intervalo ~0.13 µg/mL a 0.40 µg/mL), se espera que sea eficaz la dosis IV en humanos de 10 mg (~0.15 mg/kg; intervalo ~0.1 mg/kg [5 mg] a ~0.2 mg/kg [15 mg] cada 4-12 semanas y dosis SC de 20 mg (~0.3 mg/kg; intervalo ~0.2 mg/kg [15 mg] a ~0.4 mg/kg [30 mg]) cada 4-12 semanas.

Las proyecciones farmacocinéticas humanas se basan en los datos de concentración de dos especies (rata y mono). Las farmacocinéticas humanas se proyectan usando múltiples métodos que incluyen escala de parámetros farmacocinéticos de mono y rata, escala alométrica fija, y métodos basados en datos preclínicos y clínicos de otros anticuerpos monoclonales. Las proyecciones se realizan para disposición tanto mono como bifásica.

Método 1: Las proyecciones farmacocinéticas humanas se basan en perfiles de concentración de PG110-tiempo de

ajuste de modelo de 2 compartimientos en dos especies (rata y mono). Los parámetros farmacocinéticos humanos de PG110 se proyectan usando escala alométrica con exponentes fijos de parámetros farmacocinéticos de mono y rata.

Para depuración:

$$CL_{humana} = CL_{animal} \bullet \left(\frac{BW_{humana}}{BW_{animal}} \right)^{0.67}$$

Para volumen de distribución:

$$V_{humana} = V_{animal} \bullet \frac{BW_{humana}}{BW_{animal}}$$

Tabla 8. Predicciones de Parámetros Farmacocinéticos Humanos Con Base en la Escala Alométrica con Exponentes Fijos

	V_1 mL/kg	CL mL/hr/kg	V_2 mL/kg	CL_D mL/hr/kg
	Parámetros Farmacocinéticos de Modelo Fijo			
Rata	40.2	0.22	36.5	2.23
Mono	29.3	0.10	31.1	1.78
	Parámetros Farmacocinéticos Humanos Predichos			
Valor Humano Predicho Basado en Rata	40.2	0.034	36.5	0.35
Valor Humano Predicho Basado en Mono	29.3	0.042	31.1	0.75
Promedio	34.7	0.038	33.8	0.55

La semivida humana de PG110 luego se calcula con base en la V_1 y CL humana predicha. La semivida humana de PG110 predicha es 26 días.

Método 2: Las proyecciones farmacocinéticas humanas se basan en los datos observados de dos especies (rata y mono). La V y CL humana se proyectan usando el mismo método como en el *Método 1*. La semivida humana para PG110 se proyecta usando escala alométrica modificada con exponente fijo a 0.25:

$$T_{1/2,humana} = T_{1/2,animal} \bullet \left(\frac{BW_{humana}}{BW_{animal}} \right)^{0.25}$$

Tabla 9. Predicciones de Parámetros Farmacocinéticos Humanos Con Base en la Escala Alométrica Modificada con Exponente Fijo

	CL (mL/hr/kg)		V_{ss} (mL/kg)		$t_{1/2}$ (días)	
	Rata	Mono	Rata	Mono	Rata	Mono
PG110 Observado	0.22	0.098	70	60	8.6	19.1
Valores Humanos Predichos	0.0343	0.0410	70	60	35.2	37
Valores Humanos Predichos (Promedio)	0.0376		65		36	

Usando el *Método 2*, la semivida humana de PG110 predicha es 36 días.

Método 3: Las proyecciones farmacocinéticas humanas se basan en datos de PG110 en rata y mono y los parámetros farmacocinéticos preclínicos y clínicos de otros anticuerpos monoclonales. La escala se basa en la semivida de PG110 observada en ratas y monos y en la relación de semivida de rata/humano y mono/humano de otros anticuerpos monoclonales. Los parámetros farmacocinéticos estimados (depuración, volumen de distribución y semivida) de otros anticuerpos monoclonales en rata y mono primero se comparan con aquellos en los estudios clínicos. Las diferencias entre rata, mono y humano se estiman como una relación de rata/humano y mono/humano. Los parámetros farmacocinéticos humanos para PG110 luego se estiman con base en sus parámetros farmacocinéticos en rata o mono con una corrección de relación de rata/humano o mono/humano para otros anticuerpos monoclonales. Usando el *Método 3*, la semivida humana de PG110 predicha es 11-29 días.

Tabla 10. Predicciones de Parámetros Farmacocinéticos Humanos Con Base en la Experiencia Pasada con Otros Anticuerpos Monoclonales

	CL (mL/hr/kg)		V_{ss} (mL/kg)		$t_{1/2}$ (días)	
	R/H	M/H	R/H	M/H	R/H	M/H
Anticuerpo 1	1.35	1.88	1.33	0.53	0.93	0.69
Anticuerpo 2	3.57	1.43	1.65	0.72	0.44	0.49
Anticuerpo 3	1.58	1.46	1.35	0.71	1.05	0.78
Promedio	2.17	1.59	1.45	0.65	0.81	0.65
	Rata	Mono	Rata	Mono	Rata	Mono
PG110 Observado	0.22	0.098	70	60	8.6	19.1
Valores Humanos Predichos	0.101	0.062	48.4	92.0	11	29

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

Método 4: Las proyecciones farmacocinéticas humanas se basan en perfiles de concentración de PG110-tiempo de ajuste de modelo de dos compartimientos en dos especies (rata y mono). Los parámetros farmacocinéticos humanos de PG110 se proyectan usando escala alométrica con regresión de parámetros farmacocinéticos de mono y rata.

Tanto para depuración como volumen de distribución:

$$Log(Parámetro\ Farmacocinético) = a \times Log\ (BW) + b$$

Una regresión lineal se conduce con base en los parámetros farmacocinéticos de rata y mono y peso corporal (BW) para

estimar la inclinación (a) e intercepción (b). Los parámetros farmacocinéticos humanos de PG110 luego se estiman usando BW humano típico y la inclinación e intercepción estimadas.

Tabla 11. Predicciones de Parámetros Farmacocinéticos Humanos Con Base en la Escala Alométrica con Regresión

	BW	LnBW	V1	CL	V2	Cl_D
	kg	kg	mL	mL/hr	mL	mL/hr
Rata	0.25	-1.387	2.307	-2.907	2.210	-0.585
mono	5	1.609	4.988	-0.680	5.047	2.188
	Inclinación e Intercepción Estimadas Con Base en la Regresión Lineal					
Inclinación			0.8949	0.7432	0.947	0.9255
Intercepción			3.5475	-1.8766	3.523	0.6982
	Parámetros Farmacocinéticos Humanos Predichos					
Humana	70	4.248	1555	3.600	1894	103

La semivida humana de PG110 luego se calcula con base en los parámetros farmacocinéticos humanos predichos. La semivida humana de PG110 predicha es 12 días.

Con base en estos métodos, se espera que PG10 tenga una semivida en humanos de aproximadamente 15-30 días (intervalo 10 a 40 días) con una disposición bifásica (parámetros farmacocinéticos predichos: V_1 = 2.5 L, CL = 5.0 mL/hr, V_2 = 2.5 L, CL_D = 40 mL/hr).

Ejemplo 8: Tratamiento de Osteoartritis en Humanos con PG110

Se inicia un estudio clínico humano para probar la seguridad, tolerabilidad, y farmacocinética de PG110 en pacientes con dolor atribuido a osteoartritis de la rodilla. El diseño del estudio y resultados preliminares se describen posteriormente.

En este estudio de dosis ascendente única, doble ciego, controlado por placebo, de centro único, Fase I, se evalúan seis (6) niveles de dosis: 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 y 1 mg/kg. Por nivel de dosis, un cohorte de 7 pacientes con dolor atribuido a osteoartritis de la rodilla (42 pacientes en total) se asignaron aleatoriamente en una relación 6:1 a tratamiento con placebo o activo. Cada paciente fue administrado con una dosis única de PG110 o placebo intravenosamente durante el intervalo de 2 h en la mañana del Día 0 después de un desayuno ligero. Los pacientes permanecen en la Unidad de Farmacología Clinica (CPU) hasta aproximadamente 24 horas después del inicio de la infusión (Día 1) y regresan para las visitas en los Días 4, 7, 14, 21, 28, 56 y 84 del estudio.

Las muestras de sangre para el ensayo de PG110 se extrajeron en el Día 0 (pre-dosis, 1, 2, 3, 6 y 12 horas) y en los Días 1, 4, 7, 14, 21, 28, 56 y 84 post-dosis. Las concentraciones en suero de PG110 se determinan usando un

ensayo de ELISA validado. Los ensayos anti-PG110 también se realizan en las muestras de los Días 0 (pre-dosis), 14, 28, 56 y 84.

Las valoraciones farmacodinámicas, incluyendo la valoración de dolor el paciente, cuestionario de Índice de Osteoartritis de Western Ontario y McMaster Universities (WOMAC™), cuestionario de dolor de McGil, Prueba de Caminata de 6 minutos, Ultrasonido de la rodilla y hs-CRP, se conducen en este estudio.

Los resultados preliminares de valoración de dolor del paciente se resumen en la Tabla 12. Una valoración de dolor del paciente se usa como una valoración de intensidad de dolor. Se les pidió a los pacientes registrar sus respuestas en una VAS de 0-100 mm donde 0 mm es igual a ningún dolor y 100 mm es igual a peor dolor.

Tabla 12. PG110 en Pacientes con OA: Valoración de Dolor del Paciente (VAS)

	Valoración de Dolor del Paciente (VAS, mm, Cambio de Valor Basal) (Media ± DE)					
Tiempo (Día)	Placebo	0.003 mg/kg	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg
4	-7.2 ± 13.1	-15.8 ± 23.0	-22.8 ± 28.6	-16.5 ± 17.5	-23.0 ± 17.6	-31.7 ± 18.2
7	-10.2 ± 12.1	-14.8 ± 23.4	-12.3 ± 25.9	-26.0 ± 17.2	-34.8 ± 20.3	-32.5 ± 18.2
14	-10.6 ± 14.3	-29.7 ± 15.8	-12.5 ± 21.7	-15.5 ± 22.7	-24.3 ± 28.3	0.5 ± 17.2
21	-11.2 ± 24.1	-30.5 ± 23.9	-16.3 ± 24.9	-25.5 ± 24.1	-23.3 ± 40.7	-20.0 ± 18.5
28	-9.6 ± 11.9	-28.3 ± 25.9	-16.5 ± 22.8	-30.7 ± 22.5	-45.2 ± 22.4	-35.3 ± 20.5
56	0.5 ± 15.0	-24.3 ± 25.8	-11.8 ± 19.8	-24.0 ± 19.8	-48.8 ± 23.7	-52.8 ± 19.3
84	-7.8 ± 16.4	-25.0 ± 20.7	-9.2 ± 18.2	-21.0 ± 23.2	-29.3 ± 37.1	-34.0 ± 26.0
Máxima Valoración de Dolor del Paciente (VAS, mm)	-22.4 ± 13.0	-41.0 ± 14.5	-30.2 ± 25.3	-37.2 ± 17.7	-48.8 ± 23.7	-55.3 ± 13.7

Con base en los datos farmacodinámicos preliminares, una respuesta a la dosis evidente se observa en el intervalo de dosis de 0 a 0.3 mg/kg de PG110.

La semivida farmacológica se estima con base en la cantidad promedio de tiempo para mantener el efecto del fármaco (MRT para efecto del fármaco). Se calcula como la relación de área de la curva de efecto-tiempo de valor basal corregido de primer momento (AUMEC) vs. efecto del fármaco de valor basal corregido acumulado con el tiempo (área bajo la curva de efecto-tiempo, AUEC):

$$\text{Semivida Farmacológica} = \frac{\text{AUMEC}}{\text{AUEC}} = \frac{\int E(t)\,t\,dt}{\int E(t)\,dt}$$

Las semividas farmacológicas estimadas se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13. Semivida Farmacológica para PG110

	Dosis de PG110				
	0.003 mg/kg	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg
Semivida Farmacológica (Media ± DE) (Día)	43.0±7.5	30.9±21.6	35.8±17.9	42.7±5.0	41.9±5.4

La estimación de la semivida farmacológica se basa en datos colectados hasta la post-dosis de PG110 del día 84. Como aún existe efecto sostenido de PG110 en el Día 84, especialmente a la dosis de 0.1 mg/kg y 0.3 mg/kg, la

semivida farmacológica media estimada para PG110 es al menos 5-7 semanas, con un intervalo de al menos 4-8 semanas.

Los datos farmacodinámicos preliminares son consistentes con la dosis terapéutica proyectada (0.10 a 0.3 mg/kg o 7-21 mg). La semivida farmacológica preliminar sugiere que la dosificación cada 4-12 semanas puede ser efectiva.

Equivalentes

Aquellos expertos en el arte reconocerán, o serán capaces de comprobar usando no más de la experimentación rutinaria, muchos equivalente de las modalidades específicas de la invención descritas en la presente. Tales equivalentes se proponen para ser abarcados por las siguientes reivindicaciones. Cualquier combinación de las modalidades descritas en las reivindicaciones dependientes se contempla para estar dentro del alcance de la invención.

Incorporación para Referencia

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente pendientes referidos a la presente se incorporan para referencia en su totalidad.

SUMARIO DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID NO: 1 (PG110 V_H)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNSALKSRFTISRD
NSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSS

SEC ID NO: 2 (PG110 V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDYT
LTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIK

SEC ID NO: 3 (PG110 V_H CDR1)

GFSLTNNNVN

SEC ID NO: 4 (PG110 V_H CDR2)

GVWAGGATDYNSALKS

SEC ID NO: 5 (PG110 V_H CDR3)

DGGYSSSTLYAMDA

SEC ID NO: 6 (PG110 V_L CDR1)

RASEDIYNALA

SEC ID NO: 7 (PG110 V_L CDR2)

NTDTLHT

SEC ID NO: 8 (PG110 V_L CDR3)

QHYFHYPRT

SEC ID NO: 9 (región constante de IgG4 humana tipo silvestre)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP**S**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

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

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEC ID NO: 11 (secuencia de nucleótido de cadena pesada completa de PG110, incluyendo la secuencia señal)

ATGGAATGGAGCTGGGTGTTCCTGTTCTTCCTGAGCGTGACCACCGGCGTGCACAGCGAGGTGC
AGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCCGC
CAGCGGCTTCAGCCTGACCAACAACAACGTGAACTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTG
GAATGGGTGGGCGGCGTGTGGGCCGGGGGAGCCACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGT
TCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGA

GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGGCGGCTACAGCAGCAGCACCCTGTACGCCATG
GACGCCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGT
TCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA
GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGGGTGCAC
ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCA
GCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
GGACAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCACCCTGCCCCCCATGCCCAGCCCCCGAGTTCCTG
GGCGGACCCTCCGTGTTTCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC
CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCAGAGGTCCAGTTCAACTGGTA
CGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTTAACAGCACC
TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
GCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCCAGCTCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA
GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCACCCTCCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG
GCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCT
GTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTG
ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGAGCCTGGGCAAGTGA

SEC ID NO: 12 (secuencia de aminoácido de cadena pesada completa de PG110, incluyendo la secuencia señal)

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWA
GGATDYNSALKSRFTISRDNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT
VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEC ID NO: 13 (secuencia de aminoácido de cadena pesada madura de PG110, excluyendo la secuencia señal)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNSALKSRFTISRD
NSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKV
DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSLGK

SEC ID NO: 14 (secuencia de aminoácido de cadena ligera completa de PG110, incluyendo la secuencia señal)

ATGAGCGTGCCCACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACA
TCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTG
CAGGGCCAGCGAGGACATCTACAACGCCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCC
AAGCTGCTGATCTACAACACCGACACCCTGCACACCGGCGTGCCCAGCAGGTTCAGCGGCAGCG
GCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTT
TTGCCAGCACTACTTCCACTACCCCAGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGAGG
ACCGTGGCTGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCG
CCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA
CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC
TACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT
GCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGCTG
A

SEC ID NO: 15 (secuencia de aminoácido de cadena ligera completa de PG110, incluyendo la secuencia señal)

MSVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTD
TLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

SEC ID NO: 16 (secuencia de aminoácido de cadena ligera madura de PG110, excluyendo la secuencia señal)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDYT
LTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

2. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida

farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

3. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

4. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

5. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región

variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

6. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

7. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana, caracterizado porque la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con

una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $p75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos, y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

8. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $p75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

9. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de

cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2; y (iii) una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $p75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

10. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $p75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

11. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1; (ii) una región variable de

cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $p75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

12. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $p75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

13. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la

SEC ID NO: 2, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $p75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos.

14. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende una región constante de IgG4 humana, la región constante de IgG4 humana comprende una mutación de la región bisagra que comprende la mutación de serina en la posición de aminoácido que corresponde a la posición 108 de aminoácido de la SEC ID NO: 9.

15. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana, caracterizado porque la región constante de IgG4 humana comprende una mutación, y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

16. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana, caracterizado porque la región constante de IgG4 humana comprende una mutación y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus de

al menos 15 días.

17. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque tiene una semivida de eliminación terminal en un mono cynomolgus en un intervalo de aproximadamente 15 días a aproximadamente 28 días.

18. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque tiene una semivida de eliminación terminal en una rata de al menos 8 días.

19. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la mutación es una mutación de región bisagra.

20. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la mutación de región bisagra comprende la mutación de serina en la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9.

21. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque la serina en la posición de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9 es mutada a prolina.

22. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10.

23. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque tiene una o más de las siguientes propiedades funcionales:

a) enlaza a NGF humano pero no enlaza al factor neurotrófico derivado de cerebro humano (BDNF), neurotrofina humana 3 (NT-3) o neurotrofina humana 4 (NT-4);

b) enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos;

c) inhibe el enlace de NGF a TrkA o $p75^{NTR}$;

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

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

f) inhibe la excrecencia de neurita de célula PC12 dependiente del NGF.

24. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque no exhibe un efecto de rebote cuando se administra a un sujeto.

25. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas después de la administración de una dosis única del

anticuerpo anti-NGF a un sujeto.

26. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEC ID Nos: 3, 4 y 5, respectivamente.

27. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente.

28. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, y que comprende una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID Nos: 6, 7 y 8, respectivamente.

29. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1.

30. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado

porque comprende una región variable de cadena ligera que comprende las secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

31. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencias de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

32. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque compite para enlazar a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

33. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende una mutación de la región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un humano de al menos 10 a 30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, y en donde el anticuerpo alivia el dolor por una duración de al menos aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas después de la administración de una dosis única

del anticuerpo a un sujeto humano.

34. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque la mutación de la región bisagra comprende la mutación de serina en la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9.

35. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque la serina en la posición de aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9 es mutada a prolina.

36. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 35, caracterizado porque la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10.

37. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque tiene una o más de las siguientes propiedades funcionales:

a) enlaza a NGF humano pero no enlaza al factor neurotrófico derivado de cerebro humano (BDNF), neurotrofina humana 3 (NT-3) o neurotrofina humana 4 (NT-4);

b) enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos;

c) inhibe el enlace de NGF a TrkA o $p75^{NTR}$;

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

e) inhibe la supervivencia de ganglio de raíz

dorsal de pollo dependiente del NGF;

f) inhibe la excrecencia de neurita de célula PC12 dependiente del NGF.

38. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque compite para enlazar a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO. 2.

39. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 33, caracterizado porque alivia el dolor por una duración de al menos doce semanas después de la administración de una dosis única del anticuerpo a un sujeto humano.

40. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) caracterizado porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 13, en donde el anticuerpo tiene una semivida de suero en un humano de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

41. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque la cadena pesada se codifica por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 11.

42. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 40 o 41, caracterizado porque la cadena ligera

comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 16.

43. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 42, caracterizado porque la cadena ligera se codifica por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 14.

44. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) caracterizado porque comprende una región constante de IgG4 humana, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 13 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 16.

45. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) caracterizado porque comprende una región constante de IgG4 humana, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada codificada por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 11, y una cadena ligera codificada por la secuencia de nucleótido de la SEC ID NO: 14.

46. En anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el anticuerpo es quimérico, humanizado o humano, o un anticuerpo en el cual los epítopes de la célula T potencial han sido eliminados.

47. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende el anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-46 y un portador farmacéuticamente aceptable.

48. Un kit, caracterizado porque comprende el anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-46 e instrucciones para uso del anticuerpo para el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con NGF.

49. Un método para atenuar o inhibir una enfermedad o afección relacionada con NGF en un sujeto, caracterizado porque el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-46.

50. El método de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado porque la enfermedad o afección relacionada con NGF es el dolor.

51. El método de conformidad con la reivindicación 50, caracterizado porque el dolor se selecciona del grupo que consiste de dolor osteoartrítico, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor de metástasis ósea, cistitis intersticial, síndrome de vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis no bacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con fibromas uterinos y dolor post-operativo.

52. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 49-51, caracterizado porque el anticuerpo anti-NGF se administra a una dosis en un intervalo desde 0.1 mg/kg a 3 mg/kg.

53. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 49-52, caracterizado porque el anticuerpo se administra intravenosamente.

54. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 49-52, caracterizado porque el anticuerpo se administra subcutánea o intraarticularmente.

55. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 49-54, caracterizado porque un segundo agente farmacéutico se administra al sujeto.

56. El método de conformidad con la reivindicación 55, caracterizado porque el segundo agente farmacéutico se selecciona del grupo que consiste de NSAIDs, analgésicos incluyendo analgésicos opioides y analgésicos atípicos, anestésicos locales, bloqueos del nervio, bloqueos de fenol, anticuerpos terapéuticos, esteroides, anticonvulsivos, antidepresivos, capsaicina tópica, agentes antivirales, inhibidores de TrkA e inhibidores de PKC.

57. Un método para atenuar o inhibir el dolor en un sujeto, caracterizado porque el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de SEC ID NO: 10, y en donde el anticuerpo alivia el dolor en el sujeto para una duración de al menos aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente

doce semanas después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto.

58. El método de conformidad con la reivindicación 57, caracterizado porque el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDRs 1, 2 y 3 que tiene las secuencias de aminoácido de la SEC ID Nos: 3, 4 y 5, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tiene las secuencias de aminoácidos de SEC ID Nos: 6, 7 y 8, respectivamente.

59. El método de conformidad con la reivindicación 57 o 58, caracterizado porque el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

60. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 57-59, caracterizado porque el dolor se selecciona del grupo que consiste de dolor de osteoartritis, dolor crónico de espalda baja, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor de metástasis de hueso, cistitis intersticial, síndrome de vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con fibroides uterino y dolor post-operatorio.

61. El método de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 57-60, caracterizado porque el anticuerpo anti-NGF se administra a una dosis en un intervalo desde 0.1 a 3 mg/kg.

62. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 57-61, caracterizado porque el anticuerpo se administra intravenosamente o subcutáneamente.

63. Un método para atenuar o inhibir una enfermedad o afección relacionada con el factor de crecimiento nervioso (NGF) en un sujeto de modo que se evita un efecto de rebote en el sujeto, caracterizado porque el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende una mutación de región bisagra, y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal en un humano de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días, y en donde el anticuerpo se administra a una dosificación y a una frecuencia de modo que se evita un efecto de rebote en el sujeto.

64. El método de conformidad con la reivindicación 63, caracterizado porque la región constante de IgG4 humana comprende una mutación en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9.

65. El método de conformidad con la reivindicación

64, caracterizado porque la serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición de aminoácido 108 de la SEC ID NO: 9 es mutada a prolina.

66. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 63-65, caracterizado porque la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10.

67. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 63-66, caracterizado porque el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente.

68. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 63-67, caracterizado porque el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

69. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 63-67, caracterizado porque el anticuerpo compite por enlazar al NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la

secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2.

70. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 63-69, caracterizado porque la enfermedad o afección relacionada con NGF es dolor seleccionado del grupo que consiste de dolor por osteoartritis, dolor crónico de espalda baja, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor de metástasis de hueso, cistitis intersticial, síndrome de vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con fibroides uterino y dolor post-operatorio.

71. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 63-70, caracterizado porque el anticuerpo anti-NGF se administra a una dosis en un intervalo desde 0.1 mg/kg a 3 mg/kg.

72. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 63-71, caracterizado porque el anticuerpo se administra intravenosamente o subcutáneamente.

73. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-46, caracterizado para el uso en el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con NGF.

74. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 73, caracterizado porque la enfermedad o

afección relacionada con NGF es el dolor.

75. El anticuerpo anti-NGF de conformidad con la reivindicación 74, caracterizado porque el dolor se selecciona del grupo que consiste de dolor por osteoartritis, dolor crónico de espalda baja, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor de metástasis de hueso, cistitis intersticial, síndrome de vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con fibroides uterinos y dolor post-operatorio.

76. Uso del anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-46, para la manufactura de un medicamento para el uso en la atenuación o inhibición de una enfermedad o afección relacionada con NGF en un sujeto.

77. El uso de conformidad con la reivindicación 76, en donde la enfermedad o afección relacionada con NGF es el dolor.

78. El uso de conformidad con la reivindicación 77, en donde el dolor se selecciona del grupo que consiste de dolor osteoartrítico, dolor lumbar crónico, dolor neuropático diabético, dolor por cáncer, dolor de metástasis ósea, cistitis intersticial, síndrome de vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis no bacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con fibromas

uterinos y dolor post-operativo.

79. Uso del anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-46, para la manufactura de un medicamento para el uso en la atenuación o inhibición del dolor en un sujeto, de modo que el dolor es atenuado o inhibido en el sujeto por una duración de al menos aproximadamente cuatro semanas a aproximadamente doce semanas después de la administración de una dosis única del anticuerpo anti-NGF a un sujeto.

80. Uso de un anticuerpo anti-NGF de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-46, para la manufactura de un medicamento para el uso en la atenuación o inhibición de una enfermedad o afección relacionada con NGF en un sujeto de modo que se evita un efecto de rebote en el sujeto.

81. Un vector de expresión que codifica un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque el vector comprende la secuencia de nucleótido de SEC ID NO: 11 que incluye una cadena pesada de anticuerpo y la secuencia de nucleótido de SEC ID NO: 14 que codifica una cadena ligera de anticuerpos.

82. Una célula huésped, caracterizada porque comprende el vector de expresión de la reivindicación 81.

83. Un método de expresión de un anticuerpo anti-NGF, caracterizado porque comprende cultivar la célula

huésped de la reivindicación 82, de modo que expresa un anticuerpo anti-NGF que comprende una cadena pesada codificada por la SEC ID NO: 11 y una cadena ligera codificada por la SEC ID NO: 14.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona anticuerpos anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que contienen una región constante de IgG4 que comprende una mutación de región bisagra estabilizante y en donde los anticuerpos exhiben una semivida en suero inesperadamente larga en monos cynomolgus. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-NGF, ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos NGF, células huésped para expresar los anticuerpos NGF y métodos de uso de los anticuerpos para tratar enfermedades o afecciones relacionadas con NGF.

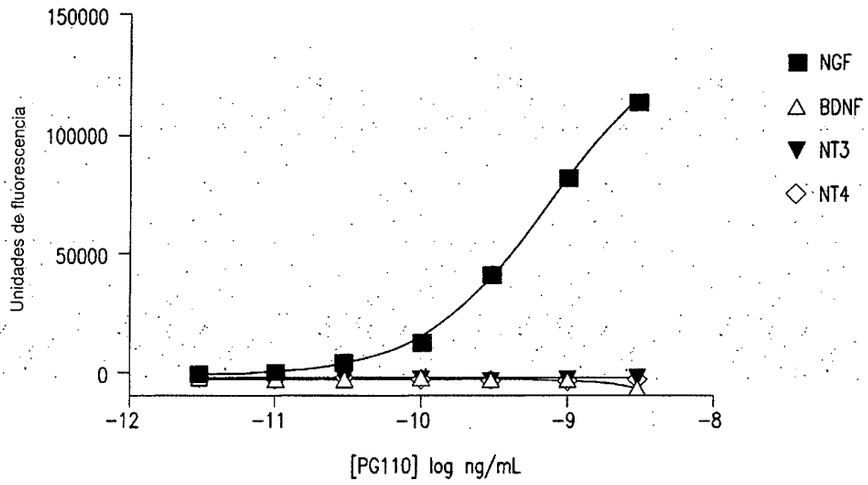

150000
100000
50000
0
Unidades de fluorescencia
−12
−11
−10
−9
−8
[PG110] log ng/mL
NGF
BDNF
NT3
NT4

FIG.1

000228

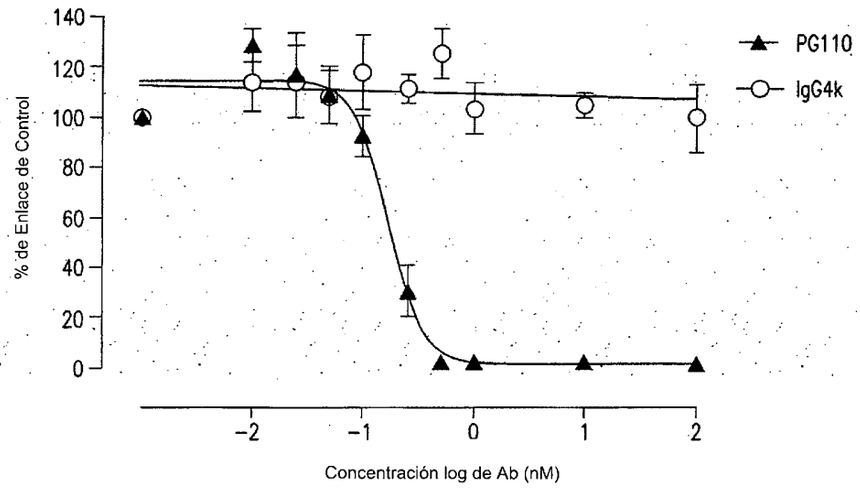


FIG.2A

000329

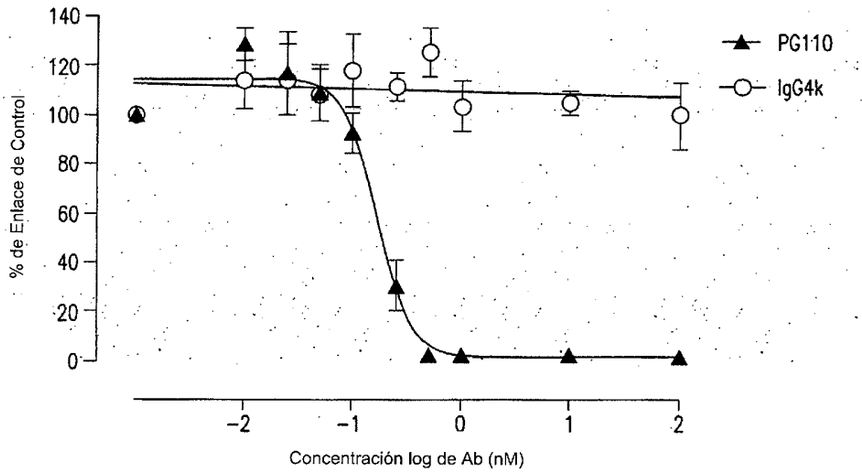


FIG.2A

000330

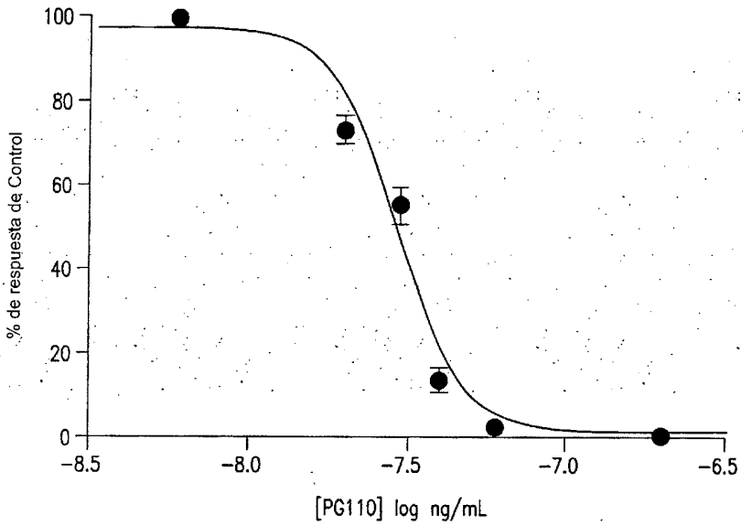


FIG.3A

000231

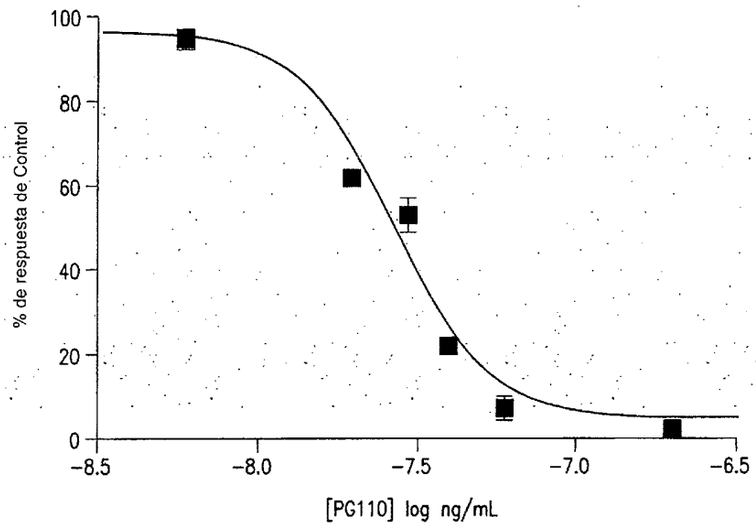


FIG.3B

000332

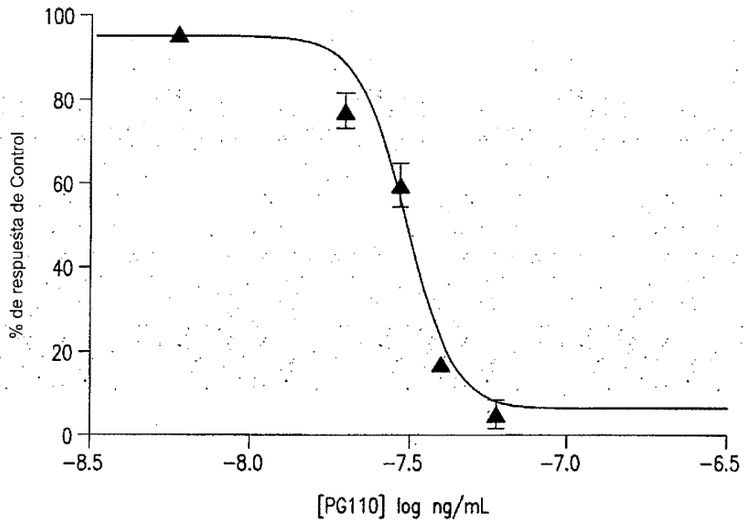
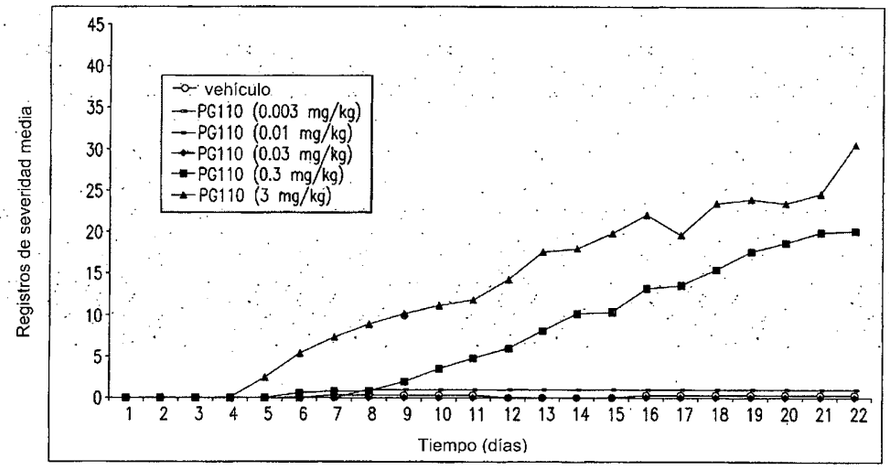

100
80
60
40
20
0
% de respuesta de Control
−8.5
−8.0
−7.5
−7.0
−6.5
[PG110] log ng/mL

FIG.3C



Registro de lesión = número x área (mm^2)

FIG.4

000334

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PANGENETICS 110, BV

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

<130> PNJ-013PC

<140> Nueva Solicitud
<141> Concurrentemente Con Esta

<150> 61/252,314
<151> 2009-10-16

<150> 61/238,813
<151> 2009-09-01

<150> 61/227,251
<151> 2009-07-21

<150> 61/175,228
<151> 2009-05-04

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

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

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 3
Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn Asn Val Asn

1 5 10

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 4
Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

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

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 5
Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala
1 5 10

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 6
Arg Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 7
Asn Thr Asp Thr Leu His Thr
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 8
Gln His Tyr Phe His Tyr Pro Arg Thr
1 5

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

<400> 9
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                325
```

<210> 10
<211> 327
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
```

260 265 270

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 11
<211> 1407
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 11
atggaatgga gctgggtgtt cctgttcttc ctgagcgtga ccaccggcgt gcacagcgag 60

gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagccag gcggcagcct gaggctgtcc 120

tgcgccgcca gcggcttcag cctgaccaac aacaacgtga actgggtgcg gcaggcccca 180

ggcaagggcc tggaatgggt gggcggcgtg tgggccgggg gagccaccga ctacaacagc 240

gccctgaaga gcaggttcac catcagcagg gacaacagca agaacaccgc ctacctgcag 300

atgaacagcc tgagggccga ggacaccgcc gtgtactact gcgccaggga cggcggctac 360

agcagcagca ccctgtacgc catggacgcc tggggccagg gcaccctggt gaccgtgagc 420

agcgccagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc cctgcagcag aagcaccagc 480

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgagcc cgtgaccgtg 540

tcctggaaca gcggagccct gaccagcggg gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 600

agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggcaccaag 660

acctacacct gcaacgtgga ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagggtggag 720

agcaagtacg gcccaccctg ccccccatgc ccagcccccg agttcctggg cggaccctcc 780

gtgtttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccgaggtg 840

acctgcgtgg tggtggacgt gagccaggaa gatccagagg tccagttcaa ctggtacgtg 900

gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagtt taacagcacc 960

tacagggtgg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020

aagtgcaagg tctccaacaa gggcctgccc agctccatcg agaaaaccat cagcaaggcc 1080

aagggccagc cacgggagcc ccaggtgtac accctgccac cctcccagga agagatgacc 1140

aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggcttct accccagcga catcgccgtg 1200

gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccacccccc agtgctggac 1260

agcgacggca gcttcttcct gtacagcagg ctgaccgtgg acaagtccag gtggcaggaa 1320

ggcaacgtct ttagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta cacccagaag 1380

agcctgtccc tgagcctggg caagtga 1407

<210> 12
<211> 468
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
```

370 375 380

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

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

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

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

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

Ser Leu Gly Lys
465

<210> 13
<211> 449
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Asn
20 25 30

Asn Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Gly Val Trp Ala Gly Gly Ala Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Met Asp Ala Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145 150 155 160

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
180 185 190

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr
210 215 220

Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 14
<211> 705
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético"

<400> 14
atgagcgtgc ccacccaggt gctgggcctg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc 60

gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcga cagggtgacc 120

atcacctgca gggccagcga ggacatctac aacgccctgg cctggtatca gcagaagccc 180

ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac accgacaccc tgcacaccgg cgtgcccagc 240

aggttcagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 300

gaggacttcg ccacctactt ttgccagcac tacttccact accccaggac cttcggccag 360

ggcaccaagg tggagatcaa gaggaccgtg gctgccccca gcgtgttcat cttcccccca 420

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 480

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 540

gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 600

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gctga 705

<210> 15
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 16
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ___ PCT _X_ MODELO DE UTILIDAD ___ DISEÑO INDUSTRIAL __

(21) Nº de solicitud: (22) Fecha de solicitud:
(51) Clasificación Internacional :

(71)Solicitante(s) **ABBOTT RESEARCH B.V.**

(72) Inventor(es) **JOHN POWELL, MARK MAGINN, DUNCAN CASSON, ANDREA BEST, WEI LIU, SANDEEP DUTTA, JERRY A. HALL**

(74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad (31)	**Nº Prioridad**	(32) **Fecha**	(33) **País**
	61/175.228	**04/05/2009**	**US**
	61/227.251	**21/07/2009**	**US**
	61/238.813	**01/09/2009**	**US**
	61/252.314	**16/10/2009**	**US**

(85) Fecha inicio fase nacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: **04/05/2010**
Nº de solicitud **PCT/IB2010/001210**

(87) Publicación internacional
Fecha: **11/11/2010**
Nº publicación: **WO 2010/128398 A1**

(54) Titulo: **ANTICUERPOS CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF) CON ESTABILIDAD IN VIVO MEJORADA**

000051

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) Nº de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) 31) Nº Prioridad (32) Fecha (33) Pais Prioridad **61/175.228 04/05/2009 US** **61/227.251 21/07/2009 US** **61/238.813 01/09/2009 US** **61/252.314 16/10/2009 US**	(51) int. Cl.: (71)Solicitante(s) **ABBOTT RESEARCH B.V.** (72) Inventor(es) **JOHN POWELL** **MARK MAGINN** **DUNCAN CASSON** **Y OTROS** (74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS A.**
(85) Fecha limite inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: **04/05/2010** Nº de solicitud **PCT/IB2010/001210**	(87) Publicación internacional Fecha: **11/11/2010** Nº publicación: **WO 2010/128398 A1**

(54) Titulo: **ANTICUERPOS CONTRA EL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF) CON ESTABILIDAD IN VIVO MEJORADA**

Reivindicación(es):

1. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 dias o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 dias.

2. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una región constante de IgG4 humana, en donde la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

3. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

4. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una región constante de IgG4 humana que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

5. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácido de las SEC ID NOs: 6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

6. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), caracterizado porque comprende (i) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 1, (ii) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 2, y (iii) una región constante que comprende una mutación de región bisagra, en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

7. Un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de IgG4 humana, caracterizado porque la región constante de IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO: 10, en donde el anticuerpo enlaza al NGF humano o de rata con una K_D de 100 pM o menos, inhibe el enlace del NGF a TrkA o $p75^{NTR}$ con una IC_{50} de 250 pM o menos, e inhibe la proliferación dependiente del NGF de células TF-1 con una IC_{50} de 50 ng/ml o menos, y en donde el anticuerpo tiene una semivida de eliminación terminal media en humanos de al menos 10-30 días o tiene una semivida farmacológica media en humanos de al menos 30 días.

...

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-161350- -00000-0000

Fecha: 2011-11-24 14:48:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 351

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

LISTA DE CHEQUEO
ADMISION A TRAMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [ ] **MODELO DE UTILIDAD** [ ] **Art. 33 Decisión 486/00**

- [ ] Indicación que se solicita una patente
- [ ] Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- [ ] Descripción de la invención
- [ ] Dibujos de ser estos pertinentes
- [ ] Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa [ ] Incompleta [ ]

PATENTE DE INVENCION PCT [X] **MODELO DE UTILIDAD PCT** [ ] **Art. 33 Decisión 486/00 Circular Única**

- [X] Indicación que se solicita una PCT
- [X] Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- [X] Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capitulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- [ ] Dibujos de ser estos pertinentes
- [X] Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa [X] Incompleta [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ] **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- [ ] Indicación que se solicita diseño industrial
- [ ] Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- [ ] Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- [ ] Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa [ ] Incompleta [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ] **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- [ ] Indicación que se solicita un esquema de trazado
- [ ] Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- [ ] Representación gráfica de un esquema de trazado
- [ ] Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa [ ] Incompleta [ ]