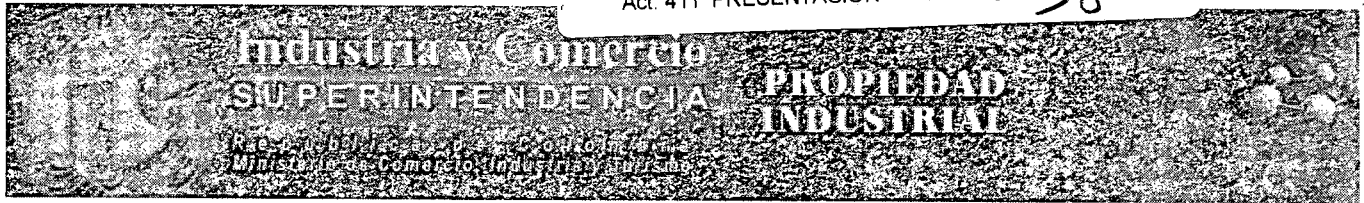




No. 12-175503- -00000-0000

Fecha: 2012-10-05 14:44:50
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 58Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

**PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE
CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF)52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: A61K 39/395, C07K 16/18,
C07K 16/28, C07K 16/22

71. SOLICITANTE: ABBOTT RESEARCH B.V.

DOMICILIO: Meeuwenlaan 4 P.O.Box 365, NL-8000 AJ
Zwolle, PAISES BAJOS

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., 05 OCT. 2012



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-175503- -00000-0000
Fecha: 2012-10-05 14:44:50
Tra. 11 PATENTE(IYI)
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 58

de radicación

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de Invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/028659	Fecha 16/03/2011
Publicación Internacional No.		WO/2011/116090 A1	Fecha 22/09/2011
3	(54) TITULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF)			
4	CLASIFICACION INTERNACIONAL (51) CIP		
A61K 39/395, C07K 16/18, C07K 16/28, C07K 16/22			
5	(71) SOLICITANTE(S) ☐ Esta persona también es inventor Para datos adicionales utilizar hoja de información adicional		
APELLIDOS O RAZON SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACION TIPO
ABBOTT RESEARCH B.V.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCION		Meeuwenlaan 4 P.O.Box 365	No. TELEFONO
CIUDAD		NL-8000 AJ Zwolle	E-MAIL
DEPARTAMENTO/ESTADO		PAISES BAJOS	NACIONALIDAD O
PAIS DE RESIDENCIA			LUGAR DE CONSTITUCION PAISES BAJOS
7	(72) INVENTOR(ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información adicional		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. FRAUNHOFER		Wolfgang	ALEMANA
2. CHARI		Ravi	ESTADOUNIDENSE
3. KUMAR		Vineet	HINDU
4. SAEDLER		Rainer	ALEMANA
5. SIEDLER		Michael	ALEMANA
6. STINE		William, B.	ESTADOUNIDENSE
7. WEBER		Carsten	ALEMANA
DIRECCION DE CORREO ELECTRONICO:			
8	DATOS INVENTOR(ES)		
PAIS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCION
1. ESTADOS UNIDOS	IL 60031	Gurnee	6290 Murifield Drive
2. ESTADOS UNIDOS	MA 01616	Worcester	76 Harley Drive, Apt. 2
3. ESTADOS UNIDOS	CT 06268	Storrs	126 Courtyard Lane
4. ALEMANIA		68163 Mannheim	Rheindammstrasse 30
5. ESTADOS UNIDOS	MA 02116	Boston	86 Marlborough St. #9
6. ESTADOS UNIDOS	MA 01545	Shrewsbury	18 Quail Hollow Drive
7. ALEMANIA		D-67133 Maxdorf	Rietburgstr. 29
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o demás inventores se indican en una hoja a continuación			
9	(74) ☐ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACION
CASTELLANOS ABONDANO		MARGARITA	C.C. 39.779.654 T.P. 70.819
DIRECCION		Calle 94A No. 7A-09	No. TELEFONO 7560770
CIUDAD		BOGOTA	E-MAIL info@castellanosyco.co
PAIS		COLOMBIA	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
1.	(33) PAIS DE ORIGEN ESTADOS UNIDOS	CODIGO PAIS US	(31) NUMERO 61/314,984	(32) FECHA (AAA/MM/DD) 2010-03-17
2.				
3.				
4.				
5.				
11	DECLARACION SOBRE USO DE RECURSOS GENETICOS O BIOLOGICOS			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen. ☐ SI ☒ NO				
NOTA: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACION SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina. ☐ SI ☒ NO				
NOTA: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCION DE TASAS			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente ☐ SI ☒ NO				
NOTA: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.		Entidades sin animo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de Comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar.
14	AUTORIZACION DE NOTIFICACION EN LINEA ☐ SI ☒ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deber ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRONICO	N° 12-0096441, 12-0096442		Fecha: Sep. 19, 2012
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)			
Margarita Castellanos Abondano MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO - APODERADO 05 OCT. 2012				
16	ORDEN Y RELACION DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica Solicitud Internacional en Castellano		Documentación Jurídica		
1. ☒ Descripción N° de folios: 159		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° de reivindicaciones: 75		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° de folios: 1		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.		
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
7. ☐ Arte final 12 x 12		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad		
8. ☒ Anexo formato digital.		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
CD-ROM QUE CONTIENE EL TEXTO DE LA DESCRIPCION, REIVINDICACIONES Y LISTADO DE SECUENCIAS EN ESPAÑOL		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0096441

Bogotá D.C., Septiembre 19 de 2012 - 14:27:43

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	444781794	19/09/2012	6.590.400.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-175503- -00000-0000

Fecha: 2012-10-05 14:44:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 58

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 12 - 0096442

Bogotá D.C., Septiembre 19 de 2012 - 14:27:43

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	444781794	19/09/2012	6.590.400.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
65	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	30.000.00	1.950.000.00
				\$1.950.000.00
=====				

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

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-175503- -00000-0000

Fecha: 2012-10-05 14:44:50

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 56

58

PODER

El (los)

ABBOTT RESEARCH B.V.Domiciliados en MEEUWENLAAN 4, P.O. BOX 365, NL-8000
AJ ZWOLLE, PAISES BAJOS

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial e intelectual y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso – administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- b) Para la obtención de registros sanitarios;
- c) Para la obtención de registros de derechos de autor.
- d) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales. .

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy

en

por

(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)
(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A – 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.com

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned

ABBOTT RESEARCH B.V.Of MEEUWENLAAN 4, P.O. BOX 365, NL-8000 AJ
ZWOLLE, NETHERLANDS

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and for MARGARITA CASTELLANOS a.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

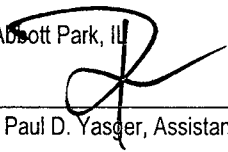
- a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- b) For the obtainment of Sanitary registrations;
- c) For the obtainment of copyright registrations
- d) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 16th day of February 2012

in Abbott Park, IL

by 
Paul D. Yasger, Assistant Secretary

(Notary shall execute on the other side)
(Consular legalization or apostille is required)

COLOMBIA

10370COO1

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

NOTARIAL CERTIFICATION (Corporation)

Hoy de del año
compareció (eron) personalmente

On this 16 day of February of 2012
personally appeared Paul D. Yasger

a quienes conozco como la(s) personas que firma(n) en
representación de la Sociedad (Compañía) denominada

whom I know to be the person(s) who signed this document as
representative(s) of the Corporation /Company named Abbott
Research B.V.

Certifico :

I certify:

a) Que ABBOTT RESEARCH B.V.

a) That ABBOTT RESEARCH B.V.

es una sociedad/Compañía legalmente constituida y
existente de acuerdo con las leyes de

is a corporation (Company legally constituted and in
existence in accordance with the laws of the Netherlands

b) Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
MEEUWENLAAN 4, P.O. BOX 365, NL-8000 AJ
ZWOLLE, PAISES BAJOS

b) That the domicile of said Corporation/Company is
MEEUWENLAAN 4, P.O. BOX 365, NL-8000 AJ ZWOLLE,
NETHERLANDS

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el
presente poder están comprendidos dentro del objeto
social de la mencionada Sociedad /Compañía.

c) That the purpose or purposes for which the present
Power of Attorney is granted are comprised within the
object set forth in the charter of the mentioned
Corporation/Company.

d) Que el Sr.
esta autorizado para otorgar el presente poder. Lo
anterior esta probado por medio de los siguientes
documentos, que certifico he visto*

d) That Mr. Paul D. Yasger
is (are) authorized to grant the present Power of
Attorney. The aforementioned was duly proven through
the following documents and I duly certify having seen
them*Power of Attorney

(Ciudad)

(City) Abbott Park

(Estado)

(State) Illinois

Hoy del

this 16 day of February of the year 2012

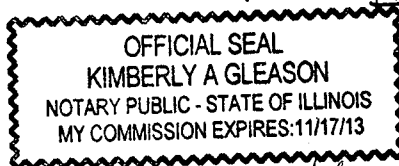
(Notario Público)

(Notary Public)

*Los documentos debe identificarse con fecha y origen.

*Documents must be identified with date and origin.

County of mchenry



Kimberly A. Gleason

CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A - 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.com



STATE OF ILLINOIS



SECRETARY OF STATE

COUNTRY OF DESTINATION: COLOMBIA

APOSTILLE

Convention de La Haye du 5 Octobre 1961

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by KIMBERLY A GLEASON
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, MCHENRY COUNTY
4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

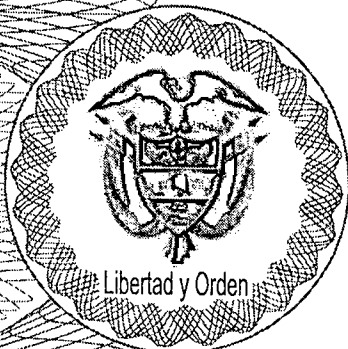
Certified

5. Springfield, Illinois
6. FEBRUARY 27, 2012
7. by the Secretary of State, State of Illinois
8. No. S012DL10475
9. Seal/Stamp:
10. Signature:

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS



This Apostille only certifies the signature and the seal or stamp it bears. It does not certify content of the document for which it was issued.
THIS APOSTILLE IS NOT VALID WITHIN THE UNITED STATES OF AMERICA.



REPÚBLICA DE COLOMBIA
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
LEGALIZACION

País: **REPUBLICA DE COLOMBIA**
(Country: - Pays:)

El presente documento público
(This public document - Le présent acte public)

Ha sido firmado por: **MENDEZ SANTANA JOSE MIGUEL**
(Has been signed by: - A été signé par:)

Actuando en calidad de: **TRADUCTOR OFICIAL**
(Acting in the capacity of: - Agissant en qualité de:)

Lleva el sello/estampilla de: **TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL**
(Bears the seal/stamp of: - Est revêtu du sceau de / timbre de:)

Certificado
(Certified - Attesté)

En: **BOGOTA D.C**
(At: - À:)

El: **4/13/2012 11:45:34 a.m.**
(On: - Le:)

Por: **APOSTILLA Y LEGALIZACIÓN**
(By: The Ministry of Foreign Affairs of Colombia - Par: Ministère des Affaires Étrangères de la Colombie)

No: **LMEN114534273**
(Under Number: - Sous le numéro:)

Nombre del Titular: **S012DL10475**
(Name of the holder of document: - Nom du titulaire:)

Tipo de documento: **TRADUCCION APOSTILLA**
(Type of document: - Type du document:)

Número de hojas: **1**
(Number of pages: - Nombre de pages:)

01304100128548700950

Firmado Digitalmente por: (Digitally Signed by:)
Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia
AMPARO DE LA CRUZ TAMAYO RODRIGUEZ
Reason: DOCUMENT AUTHENTICITY
BOGOTA - COLOMBIA

La autenticidad de este documento puede ser verificada en el Registro Electrónico que se encuentra en la siguiente página
The authenticity of this document may be verified by accessing the e-Register on the following web site:
L'authenticité de cette document peut être vérifiée en accédant l'e-Registre sur le site web suivant:

www.cancilleria.gov.co/legalizaciones

9

Traducción Oficial del Idioma Inglés del sello notarial y la Apostille adjuntos al poder que la Abbott Research B.V., domiciliada en NL-8000 AJ ZWOLLE, PAISES BAJOS, otorga a Ximena Castellanos A. y/o Margarita Castellanos A.

SELLO OFICIAL
KIMBERLY A. GLEASON
NOTARIA PÚBLICA - ESTADO DE ILLINOIS
MI COMISIÓN EXPIRA: 11/17/13

ESTADO DE ILLINOIS
SECRETARÍA DE ESTADO

PAIS DE DESTINO: COLOMBIA

APOSTILLE

Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. Está firmado por: KIMBERLY A. GLEASON
3. En su calidad de: NOTARIA PUBLICA, CONDADO DE MCHENRY
4. Y lleva el sello oficial: DEL ESTADO DE ILLINOIS

Certificado

5. En: Springfield, Illinois
6. El día: 27 DE FEBRERO DE 2012
7. Por: El Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. Bajo el No. S012DL10475
9. Sello: SELLO DEL ESTADO DE ILLINOIS • AGOSTO 26 DE 1818
10. Firma:

JESSE WHITE

SECRETARIO DE ESTADO

ESTADO DE ILLINOIS

M. Méndez S.
JOSE MIGUEL MENDEZ

Traductor Oficial

Res. 911 de Mayo 1988 MINJUSTICIA

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
22 September 2011 (22.09.2011)(10) International Publication Number
WO 2011/116090 A1

PCT

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)

(74) Agents: REMILLARD, Jane, E. et al.; Nelson Mullins
Riley & Scarborough LLP, One Post Office Square,
Boston, MA 02109-2127 (US).

(21) International Application Number:

PCT/US2011/028659

(22) International Filing Date:

16 March 2011 (16.03.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/314,984 17 March 2010 (17.03.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): AB-
BOTT RESEARCH B.V. [NL/NL]; Meeuwenlaan 4,
P.O.Box 365, NL-8000 AJ Zwolle (NL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FRAUNHOFER,
Wolfgang [DE/US]; 6290 Murifield Drive, Gurnee, IL
60031 (US). CHARI, Ravi [US/US]; 76 Harley Drive,
Apt. 2, Worcester, MA 01616 (US). KUMAR, Vineet
[IN/US]; 126 Courtyard Lane, Storrs, CT 06268 (US).
SAEDLER, Rainer [DE/DE]; Rheindammstrasse 30,
68163 Mannheim (DE). SIEDLER, Michael [DE/US];
86 Marlborough St. #9, Boston, MA 02116 (US). STINE,
William, B. [US/US]; 18 Quail Hollow Drive, Shrews-
bury, MA 01545 (US). WEBER, Carsten [DE/DE]; Ri-
etburgstr. 29, D-67133 Maxdorf (DE).

(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, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CL, 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: ANTI-NERVE GROWTH FACTOR (NGF) ANTIBODY COMPOSITIONS

(57) Abstract: The present invention relates to stable compositions of anti-NGF antibodies, and antigen-binding fragments there-
of, and their uses in the prevention and/or treatment of various diseases and disorders in which NGF activity is detrimental, e.g.,
pain disorders.

WO 2011/116090 A1

ANTI-NERVE GROWTH FACTOR (NGF) ANTIBODY COMPOSITIONS

Related Application

5 This application claims priority to U.S. Provisional Patent Application No. 61/314,984, filed on March 17, 2010, the contents of which are incorporated herein by reference.

Background of the Invention

10

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
15 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,
20 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
25 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
30 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
35 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,

We claim:

1. A pharmaceutical composition comprising:
 - (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody, or antigen binding fragment thereof;
 - 5 (b) a histidine buffer at a concentration of about 5 to about 60 mM; and
 - (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to about 0.1%;wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.
2. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein said composition comprises about 10 to about 30 mM histidine.
- 10 3. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the pH is about 5.5.
4. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the composition comprises about 0.01 % to about 0.02% polysorbate 80.
5. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the composition further comprises about 1 to about 100 mg/mL of a polyol.
- 15 6. The pharmaceutical composition of claim 5, wherein the polyol is selected from the group consisting of sorbitol and mannitol.
7. The pharmaceutical composition of claim 6, wherein the polyol is mannitol.
8. The pharmaceutical composition of claim 7, wherein the composition comprises about 10 to about 30 mg/mL mannitol.
- 20 9. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the composition further comprises about 10 to about 100 mg/mL of a sugar.
10. The pharmaceutical composition of claim 9, wherein the sugar is sucrose.
11. The pharmaceutical composition of claim 10, wherein the composition comprises about 10 to about 70 mg/mL sucrose.
- 25 12. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein said composition does not comprise a polyol or a sugar.
13. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein said composition does not comprise methionine.

14. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the concentration of the antibody, or antigen-binding portion thereof, is about 1 to about 240 mg/mL.
15. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the concentration of the antibody, or antigen-binding portion thereof, is about 20 to about 120 mg/mL.
- 5 16. The pharmaceutical composition of any one of claims 1-11 and 13-15, wherein the molar ratio of (a) anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof, to (b) polyol, sugar, or combination thereof, is greater than 1:1400.
17. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein said composition
10 comprises:
 (a) about 20 mg/mL of the antibody, or antigen-binding portion thereof;
 (b) about 15 mM histidine; and
 (c) about 0.01% polysorbate 80;
 wherein the pH of the formulation is about 5.5.
- 15 18. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein said composition comprises:
 (a) about 60 mg/mL of the antibody, or antigen-binding portion thereof;
 (b) about 30 mM histidine; and
 (c) about 0.02% polysorbate 80;
 20 wherein the pH of the formulation is about 5.5.
19. The pharmaceutical composition of claim 1, which is suitable for lyophilization.
20. A lyophilized pharmaceutical composition comprising:
 (a) about 1 to about 120 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding
 fragment thereof;
 25 (b) about 1 to about 10 mg of histidine; and
 (c) about 0.1 to about 0.4 mg of polysorbate 80.
21. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 20, wherein the composition comprises:
 (a) about 60 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof;
 30 (b) about 4.7 mg of histidine; and
 (c) about 0.2 mg of polysorbate 80.
22. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 20, wherein the composition comprises:

- (a) about 20 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof;
 - (b) about 2.3 mg of histidine; and
 - (c) about 0.1 mg of polysorbate 80.
23. The lyophilized pharmaceutical composition of any one of claims 20 to 22,
5 further comprising about 1 to about 100 mg of a polyol.
24. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 23, wherein the polyol is about 10 to about 50 mg mannitol.
25. The lyophilized pharmaceutical composition of any one of claims 20 to 24, further comprising about 1 to about 100 mg of a sugar.
- 10 26. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 25, wherein the sugar is about 1 to 100 mg sucrose.
27. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the anti-NGF antibody, or antigen-binding portion thereof, binds to human NGF.
28. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the
15 anti-NGF antibody, or antigen-binding portion thereof, comprises a human IgG4 constant region.
29. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the anti-NGF antibody, or antigen-binding portion comprises a hinge region mutation.
30. The pharmaceutical composition of claim 29, wherein the hinge region mutation
20 comprises a mutation of a serine at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9.
31. The pharmaceutical composition of claim 29, wherein the serine at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 is mutated to proline.
32. The pharmaceutical composition of claim 29, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10.
- 25 33. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, 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; and
 - 5 f) inhibits NGF-dependent PC12 cell neurite outgrowth.
34. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, does not exhibit a rebound effect when administered to a subject.
35. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the
10 antibody, or antigen-binding portion thereof, 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.
36. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the
15 antibody, or antigen-binding portion thereof, 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.
37. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.
- 20 38. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.
39. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the
25 antibody, or antigen-binding portion thereof, 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.
40. The pharmaceutical composition of any one of claims 1-26, wherein the
30 antibody, or antigen-binding portion thereof, comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13.

41. The pharmaceutical composition of any one claims 1-26 and 40, wherein the antibody, or antigen binding portion thereof, comprises a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16.
42. A pharmaceutical composition comprising:
- 5 (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody, or antigen binding fragment thereof, 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 having the
- 10 amino acid sequence of SEQ ID NO:10, wherein the concentration of the antibody, or antigen binding fragment thereof, is about 10 to about 50 mg/mL;
- (b) a histidine buffer at a concentration of about 10 to about 30 mM histidine; and
- (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to 0.02%;
- 15 wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.
43. A pharmaceutical composition comprising:
- (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, (ii) a light chain variable region having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, and (iii) a human
- 20 IgG4 constant region comprising a hinge region mutation at position 108 of SEQ ID NO: 9, wherein the concentration of the antibody, or antigen binding fragment thereof, is about 10 to about 50 mg/mL;
- (b) a histidine buffer at a concentration of about 10 to about 30 mM histidine; and
- 25 (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to 0.02%;
- wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.
44. A pharmaceutical composition comprising:
- (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the antibody comprises a heavy chain having the amino acid
- 30 sequence of SEQ ID NO:13 and a light chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO:16, wherein the concentration of the antibody, or antigen binding fragment thereof, is about 10 to about 50 mg/mL;
- (b) a histidine buffer at a concentration of about 10 to about 30 mM histidine; and
- 35 (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to 0.02%;
- wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.

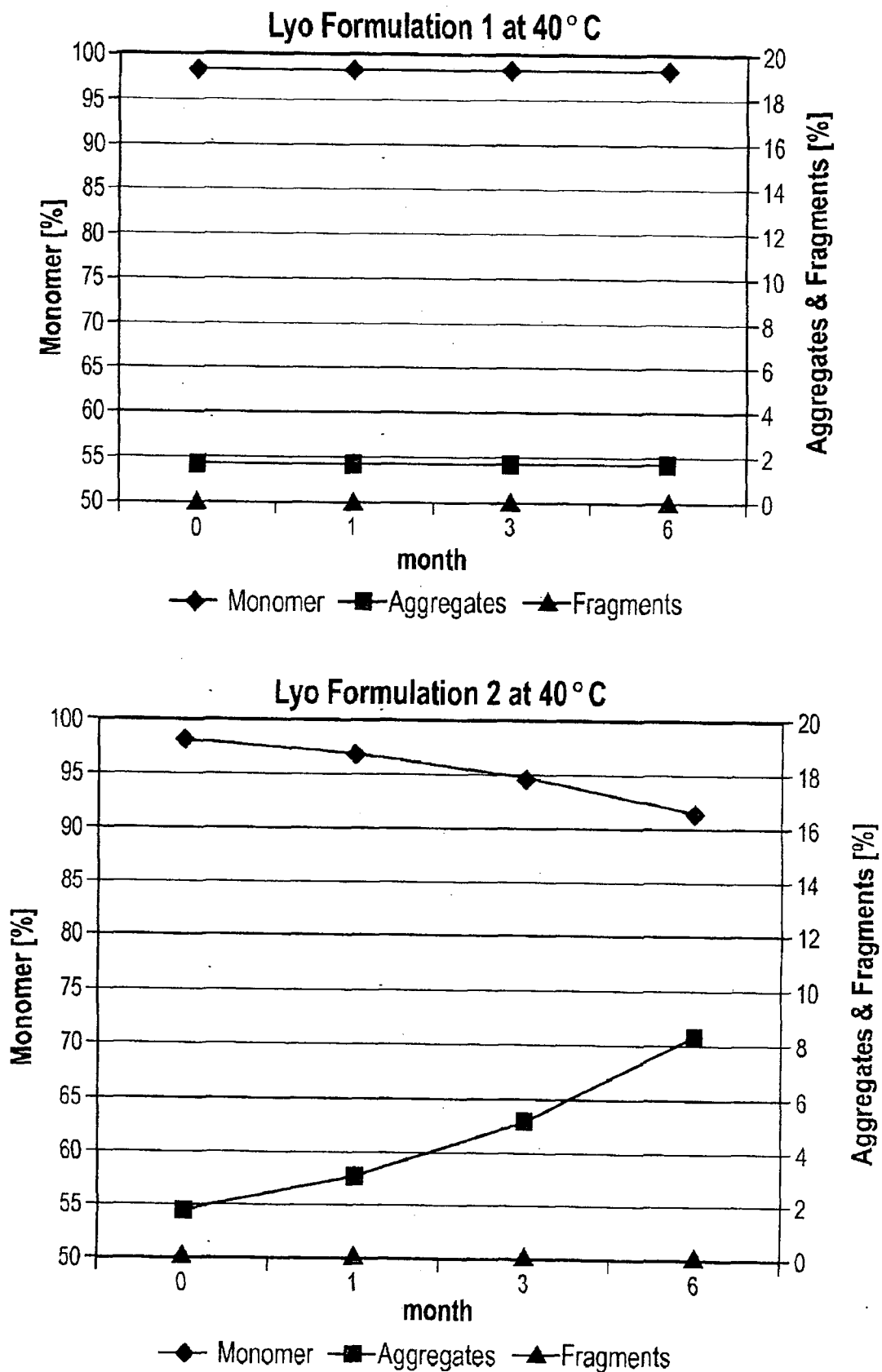
45. The pharmaceutical composition of any one of claims 42 to 44, further comprising about 10 to about 50 mg/mL mannitol.
46. The pharmaceutical composition of any one of claims 42 to 45, further comprising about 5 to about 70 mg/mL sucrose.
- 5 47. The pharmaceutical composition of any one of claims 42 to 44, consisting essentially of:
- (a) about 10 to 30 mg/mL of the antibody or antigen-binding fragment thereof;
 - (b) about 15 mM histidine buffer; and
 - (c) about 0.01% polysorbate 80;
- 10 wherein the pH of the composition is about 5.5.
48. The pharmaceutical composition of claim 45, consisting essentially of:
- (a) about 10 to 30 mg/mL of the antibody or antigen-binding fragment thereof;
 - (b) about 15 mM histidine buffer;
 - (c) about 0.01% polysorbate 80; and
 - 15 (d) about 10 to 30 mg/mL mannitol;
- wherein the pH of the composition is about 5.5.
49. The pharmaceutical composition of claim 46, consisting essentially of:
- (a) about 10 to 30 mg/mL of the antibody or antigen-binding fragment thereof;
 - (b) about 15 mM histidine buffer;
 - 20 (c) about 0.01% polysorbate 80; and
 - (d) about 40 to 70 mg/mL sucrose;
- wherein the pH of the composition is about 5.5.
50. The pharmaceutical composition of claim 46, consisting essentially of:
- 25 (a) about 10 to 30 mg/mL of the antibody or antigen-binding fragment thereof;
 - (b) about 15 mM histidine buffer;
 - (c) about 0.01% polysorbate 80;
 - (d) about 10 to 30 mg/mL mannitol; and
 - (e) about 5 to 10 mg/mL sucrose;
- 30 wherein the pH of the composition is about 5.5.
51. The pharmaceutical composition of any one of claims 42 to 50, wherein the ratio of antibody, or antigen binding fragment thereof, to polyol and or sugar is greater than 1:1400.

52. The pharmaceutical composition of any one of claims 42 to 51, wherein the pharmaceutical composition is lyophilized.
53. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, is selected from the group consisting of a
5 monoclonal antibody, a human antibody, a humanized antibody, a chimerical antibody, a CDR-grafted antibody, a Fab, a Fab', a F(ab')₂, a Fv, a disulfide linked Fv, a scFv, a single domain antibody, a diabody, a multispecific antibody, a dual specific antibody, and a bispecific antibody.
54. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the
10 antibody, or antigen-binding portion thereof, is the antibody PG110.
55. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable in a liquid form for at least about 3 months.
56. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable in a liquid form for at least about 12 months.
- 15 57. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable for at least 3 months in a frozen or lyophilized form.
58. The pharmaceutical composition of claim 57, wherein the formulation is stable for at least 6 months in frozen or lyophilized form.
59. The pharmaceutical composition of claim 57, wherein the formulation is stable
20 for at least 12 months in a frozen or lyophilized form.
59. The pharmaceutical composition of claims 55 or 56, wherein the formulation is stored at 2-8°C.
60. The pharmaceutical composition of claims 57 or 58, wherein the formulation is stored frozen at -80°C.
- 25 61. The pharmaceutical composition of claims 57 or 58, wherein the formulation is stored in lyophilized form at 2-8°C.
62. The pharmaceutical composition of claims 57 or 58, wherein the formulation is stored in lyophilized form at room temperature.

63. The pharmaceutical composition of any one of claims 55 to 63, wherein there is less than about 10% aggregation of the antibody.
64. The pharmaceutical composition of any one of claims 55 to 63, wherein there is less than about 3% aggregation of the antibody.
- 5 65. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the formulation is suitable for intravenous, subcutaneous and/or intramuscular administration.
66. A device comprising the pharmaceutical composition of any one of claims 1-65.
67. The device of claim 66, wherein the device is selected from the group consisting of a syringe, a pen, an implant, a needle-free injection device, an inhalation device, and a patch.
- 10 68. An article of manufacture comprising the pharmaceutical composition or device of any one of claims 1-67.
69. Use of the pharmaceutical composition of any one of claims 1-65, or the device of any one of claims 66-67, to treat an NGF mediated disease or condition.
- 15 70. The use of claim 69, wherein the NGF mediated disease or condition is pain.
71. The use of claim 70, 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.
- 20 72. The use of any one of claims 69-71, wherein pharmaceutical compositions is suitable for administration of the anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof at a dose in a range from 0.1 mg/kg to 10/mg/kg.
- 25 73. The use of any one of claims 69-72, wherein the pharmaceutical composition is suitable for administration intravenously, subcutaneously or intra-articularly.
74. The use of any one of claims 69-74, wherein the pharmaceutical composition is suitable for administration with a second pharmaceutical agent.

75. The use of claim 74, 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.
- 5

Figure 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/028659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/395 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/22
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)

A61K 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, 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.
Y	US 2010/055097 A1 (KAISHEVA ELIZABET A [US] ET AL) 4 March 2010 (2010-03-04) page 7, paragraph 12 - paragraph 13; example 5	1-28, 33-39, 41,53-73
Y	----- WO 2006/131951 A2 (LAY LINE GENOMICS S P A [IT]; PAVONE FLAMINIA [IT]; MARTINELLI SARA [I] 14 December 2006 (2006-12-14) the whole document ----- -/--	1-28, 33-39, 41,53-73

☒ 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

19 July 2011

Date of mailing of the international search report

26/07/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fellows, Edward

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/028659

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANGAL S ET AL: "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 30, no. 1, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 105-108, XP023620736, ISSN: 0161-5890, DOI: DOI:10.1016/0161-5890(93)90432-B [retrieved on 1993-01-01] the whole document	29-32, 40,42-52
A	WO 2006/110883 A2 (RINAL NEUROSCIENCE CORP [US]; ROSENTHAL ARNON [US]; SHELTON DAVID L [U] 19 October 2006 (2006-10-19) the whole document	1-75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/028659

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010055097	A1	04-03-2010	US 2003113316 A1	19-06-2003
			US 2006029599 A1	09-02-2006

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 A	27-11-2008
			JP 2008542440 A	27-11-2008
			KR 20080026593 A	25-03-2008
			US 2010291083 A1	18-11-2010
			US 2009208490 A1	20-08-2009

WO 2006110883	A2	19-10-2006	AR 055323 A1	15-08-2007
			AU 2006235559 A1	19-10-2006
			BR PI0610463 A2	22-06-2010
			CA 2604443 A1	19-10-2006
			CN 101217978 A	09-07-2008
			EP 1871416 A2	02-01-2008
			EP 2305711 A2	06-04-2011
			JP 2008535929 A	04-09-2008
			KR 20070119748 A	20-12-2007
			KR 20100135336 A	24-12-2010
			NZ 562229 A	30-04-2010
			US 2011033447 A1	10-02-2011
			ZA 200708362 A	30-12-2009

COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF)

Solicitud relacionada

Esta solicitud invoca prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EE.UU. Nº 61/314.984, presentada el 17 de marzo, 2010, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una proteína secretada que fue descubierta hace más de 50 años como una molécula que promueve la supervivencia y la diferenciación de las neuronas sensoriales y simpáticas. La cadena beta del NGF es la única responsable de la actividad estimulante del crecimiento nervioso del NGF. La cadena beta se homodimeriza y es incorporada en un complejo proteico más grande. El NGF es un miembro de una familia de factores neurotróficos conocidos como neurotrofinas. El NGF se une con gran afinidad a una quinasa receptora de tropomiosina conocida como TrkA. El NGF también tiene la capacidad de unirse a un receptor conocido como p75NTR, un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, que también interactúa con otras neurotrofinas. Se puede consultar una revisión de la estructura y la función del NGF, por ejemplo, en Sofroniew, M.V. et al., (2001) Annu. Rev. Neurosci., 24: 1217-1281; Weismann, C. y de Vos, A.M. (2001) Cell. Mol. Life Sci., 58: 748-759; Fahnstock, M. (1991) Curr. Top. Microbiol. Immunol., 165: 1-26.

Aunque el NGF fue identificado originalmente en virtud de su capacidad de promover la supervivencia y la diferenciación de las neuronas, hay cada vez más evidencias de que estos efectos sobre el desarrollo son tan solo un aspecto de la biología del NGF. En particular, se ha relacionado el NGF con la transmisión y el mantenimiento del dolor persistente o crónico. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración local y sistémica del NGF provoca hiperalgesia y alodinia (Lewin, G.R. et al. (1994) Eur. J. Neurosci. 6:1903-1912). La administración intravenosa del NGF en seres humanos da como resultado mialgia en

todo el cuerpo, mientras que la administración local evoca hiperalgesia y alodinia en el sitio de la inyección, además de los efectos sistémicos (Apfel, S.C. et al. (1998) *Neurology* 51: 695-702). Además, en determinadas formas de cáncer, el exceso de NGF facilita el crecimiento y la infiltración de fibras nerviosas, con la inducción de dolor debido al cáncer (Zhu, Z. et al. (1999) *J. Clin. Oncol.* 17: 241-228).

La participación del NGF en el dolor crónico ha suscitado un interés considerable en los enfoques terapéuticos basados en la inhibición de los efectos del NGF (véase, por ejemplo, Saragovi, H.U. y Gehring, K. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.*, 21: 93-98). Por ejemplo, se ha usado una forma soluble del receptor de TrkA para bloquear la actividad del NGF, con lo cual se demostró que se reducía significativamente la formación de neuromas, responsables del dolor neuropático, sin dañar los cuerpos celulares de las neuronas dañadas (Kryger, G.S. et al. (2001) *J. Hand Surg. (Am.)*, 26: 635-644).

Otro enfoque para neutralizar la actividad del NGF comprende el uso de anticuerpos anti-NGF, y se han descrito ejemplos de estos anticuerpos (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO 2001/78698, WO 2001/64247, WO 2002/096458, WO 2004/032870, WO 2005/061540, WO 2006/131951, WO 2006/110883, la Patente de los EEUU N°: 7449616; las Publicaciones Patentes de los EE.UU. N°: US 20050074821, US 20080033157, US 20080182978 y US 20090041717). En modelos de dolor neuropático en animales (por ejemplo, el dolor producido mediante ligadura de los nervios troncales o espinales), la aplicación de una inyección sistémica de anticuerpos capaces de neutralizar el NGF previene la alodinia y la hiperalgesia (Ramer, M.S. y 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 una reducción significativa del dolor en un modelo de dolor provocado por cáncer en ratones (Sevcik, M.A. et al., (2005) *Pain*, 115: 128-141).

Las formulaciones anteriores que contienen anticuerpos anti-NGF (por ejemplo, PG110) han adolecido de la inestabilidad física del anticuerpo en la formulación, como queda

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende
 - (a) un anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso (NGF) o un fragmento de unión al antígeno de éste;
 - (b) un amortiguador de histidina en una concentración de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 60 mM; y
 - (c) polisorbato 80 en una concentración de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,1%;donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende histidina aproximadamente entre 10 y 30 mM.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el pH es de aproximadamente 5,5.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la composición comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,02% de polisorbato 80.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la composición también comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg/ml de un poliol.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste en el sorbitol y el manitol.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde el poliol es manitol.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en donde la composición comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 mg/ml de manitol.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la composición también comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 mg/ml de un azúcar.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en donde el azúcar es la

sacarosa.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde la composición comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70 mg/ml de sacarosa.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición no comprende un poliol o un azúcar.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición no comprende metionina.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la concentración del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de éste es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 240 mg/ml.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la concentración del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de éste es de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 120 mg/ml.
16. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y 13-15, en donde la relación molar de (a) un anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, a (b) un poliol, azúcar o una combinación de los mismos, es mayor que 1:1400.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende
 - (a) aproximadamente 20 mg/ml del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de éste;
 - (b) histidina aproximadamente 15 mM; y
 - (c) aproximadamente 0,01% de polisorbato 80;donde el pH de la formulación es de aproximadamente 5,5.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende
 - (a) aproximadamente 60 mg/ml del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de

éste;

- (b) histidina aproximadamente 30 mM; y
- (c) aproximadamente 0,02% de polisorbato 80;

donde el pH de la formulación es de aproximadamente 5,5.

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde es apropiada para la liofilización.

20. Una composición liofilizada farmacéutica que comprende

- (a) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 120 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste;
- (b) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg de histidina; y
- (c) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,4 mg de polisorbato 80.

21. La composición liofilizada farmacéutica de la reivindicación 20, en donde la composición comprende

- (a) aproximadamente 60 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste;
- (b) aproximadamente 4,7 mg de histidina; y
- (c) aproximadamente 0,2 mg de polisorbato 80.

22. La composición liofilizada farmacéutica de la reivindicación 20, en donde la composición comprende

- (a) aproximadamente 20 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste;
- (b) aproximadamente 2,3 mg de histidina; y
- (c) aproximadamente 0,1 mg de polisorbato 80.

23. La composición liofilizada farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en donde también comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg de un poliol.

24. La composición liofilizada farmacéutica de la reivindicación 23, en donde el poliol

comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg manitol.

25. La composición liofilizada farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en donde también comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg de un azúcar.

26. La composición liofilizada farmacéutica de la reivindicación 25, en donde el azúcar comprende aproximadamente entre 1 y 100 mg de sacarosa.

27. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo anti-NGF, o la porción de unión al antígeno de éste, se une al NGF humano.

28. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo anti-NGF, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una región constante de la IgG4 humana.

29. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo anti-NGF, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una mutación en la región de la bisagra.

30. La composición farmacéutica de la reivindicación 29, en donde la mutación en la región de la bisagra comprende una mutación en la serina en la posición del aminoácido 108 de SEQ ID N° 9.

31. La composición farmacéutica de la reivindicación 29, en donde la serina en la posición del aminoácido 108 de SEQ ID N° 9 se muta en prolina.

32. La composición farmacéutica de la reivindicación 29, en donde la región constante de la IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 10.

33. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, tiene una o más de las siguientes propiedades funcionales:

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

- b) se une al NGF humano o de rata con una KD de 100 pM o menos;
 - c) inhibe la unión del NGF a TrkA o a p75NTR;
 - d) inhibe la proliferación de las células TF-1 dependiente del NGF;
 - e) inhibe la supervivencia del ganglio de la raíz dorsal del pollo dependiente del NGF;
 - f) inhibe el desarrollo de las neuritas de las células PC12 dependiente del NGF.
34. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, no presenta un efecto de rebote cuando se lo administra a un sujeto.
35. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 3, 4 y 5, respectivamente.
36. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una región variable de la cadena liviana que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 6, 7 y 8, respectivamente.
37. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1.
38. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2.
39. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, compite por la unión al NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2.

40. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 13.

41. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 y 40, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, también comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16, en donde el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, además comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16.

42. Una composición farmacéutica, que comprende:

(a) un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende (i) una región variable de la cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N°:3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de la cadena liviana que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N°:6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de la IgG4 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:10, en donde la concentración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/ml;

(b) una solución amortiguadora de histidina a una concentración de histidina de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 mM; y

(c) polisorbato 80 a una concentración de entre aproximadamente 0,01% y 0,02%;

en donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.

43. Una composición farmacéutica, que comprende:

(a) un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:1, (ii) una región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:2 y (iii) una región constante de la IgG4 humana que comprende una mutación en la región bisagra en la posición 108 de la SEQ ID N°: 9, en donde la concentración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/ml;

(b) una solución amortiguadora de histidina a una concentración de histidina de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 mM; y

(c) polisorbato 80 a una concentración de entre aproximadamente 0,01% y 0,02%; en donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.

44. Una composición farmacéutica, que comprende:

(a) un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de la IgG4 humana, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:13 y una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:16, en donde la concentración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/ml;

(b) una solución amortiguadora de histidina a una concentración de histidina de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 mM; y

(c) polisorbato 80 a una concentración de entre aproximadamente 0,01% y 0,02%; en donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.

45. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, que comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/ml de manitol.

46. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 45, que

comprende entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mg/ml de sacarosa.

47. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, que consiste esencialmente de:

(a) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo;

(b) aproximadamente 15 mM de solución amortiguadora de histidina; y

(c) aproximadamente 0,01% de polisorbato 80;

en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5,5.

48. La composición farmacéutica de la reivindicación 45, que consiste esencialmente de:

(a) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo;

(b) aproximadamente 15 mM de solución amortiguadora de histidina; y

(c) aproximadamente 0,01% de polisorbato 80; y

(d) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml de manitol;

en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5,5.

49. La composición farmacéutica de la reivindicación 46, que consiste esencialmente de:

(a) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo;

(b) aproximadamente 15 mM de solución amortiguadora de histidina; y

(c) aproximadamente 0,01% de polisorbato 80; y

(d) entre aproximadamente 40 y 70 mg/ml de sacarosa;

en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5,5.

50. La composición farmacéutica de la reivindicación 46, que consiste esencialmente de:

(a) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

del mismo;

- (b) aproximadamente 15 mM de solución amortiguadora de histidina; y
- (c) aproximadamente 0,01% de polisorbato 80;
- (d) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml de manitol; y
- (e) entre aproximadamente 5 y 10 mg/ml de sacarosa;

en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5,5.

51. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 50, en donde la relación de anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, a poliol y/o azúcar es mayor que 1-69:1400:

52. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 51, en donde la composición farmacéutica está liofilizada.

53. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con una CDR injertada, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv con enlaces disulfuro, un scFv, un anticuerpo de un solo dominio, un díacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo con especificidad dual y un anticuerpo biespecífico.

54. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, es el anticuerpo PG110.

55. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable en una forma líquida durante al menos aproximadamente 3 meses.

56. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable en una forma líquida durante al menos aproximadamente 12 meses.

57. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes,

en donde la formulación es estable durante al menos 3 meses en una forma congelada o liofilizada.

58. La composición farmacéutica de la reivindicación 57, en donde la formulación es estable durante por lo menos 6 meses en una forma congelada o liofilizada.

59. La composición farmacéutica de la reivindicación 57, en donde la formulación es estable durante por lo menos 12 meses en una forma congelada o liofilizada.

59. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 55 ó 56, en donde la formulación se guarda a 2-8°C.

60. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 57 ó 58, en donde la formulación se guarda congelada a -80°C.

61. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 57 ó 58, en donde la formulación se guarda en forma liofilizada a 2-8°C.

62. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 57 ó 58, en donde la formulación se guarda en forma liofilizada a temperatura ambiente.

63. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 55 a 63, en donde hay menos que aproximadamente un 10% de agregación del anticuerpo.

64. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 55 a 63, en donde hay menos que aproximadamente un 3% de agregación del anticuerpo.

65. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es apropiada para la administración intravenosa, subcutánea y/o intramuscular.

66. Un dispositivo que comprende la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-65.

67. El dispositivo de la reivindicación 66, en donde el dispositivo se selecciona del grupo que consiste en una jeringa, una lanceta, un implante, un dispositivo de inyección libre de agujas, un dispositivo de inhalación y un parche.

68. Un artículo de manufactura que comprende la composición farmacéutica o el

dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-67.

69. Uso de la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-65, o del dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 66-67, en donde es para tratar una enfermedad o condición mediada por NGF.

70. El uso de la reivindicación 69, en donde la enfermedad o la afección relacionada con el NGF son el dolor.

71. El uso de la reivindicación 70, en donde el dolor se selecciona del grupo que consiste en el dolor provocado por la osteoartritis, el dolor crónico en la parte baja de la espalda, el dolor neuropático de origen diabético, el dolor provocado por el cáncer, el dolor provocado por las metástasis en los huesos, la cistitis intersticial, el síndrome de la vejiga dolorosa, el dolor asociado con la prostatitis abacteriana crónica, el dolor asociado con la endometriosis, el dolor asociado con los fibroides uterinos y el dolor postoperatorio.

72. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 69-71, en donde la composición farmacéutica es adecuada para la administración del anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, a una dosis en un rango de entre 0,1 mg/kg y 10/mg/kg.

73. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 69-72, en donde la composición farmacéutica es adecuada para una administración por vía intravenosa, subcutánea o intra-articular.

74. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 69-74, en donde la composición farmacéutica es adecuada para su administración con un segundo agente farmacéutico.

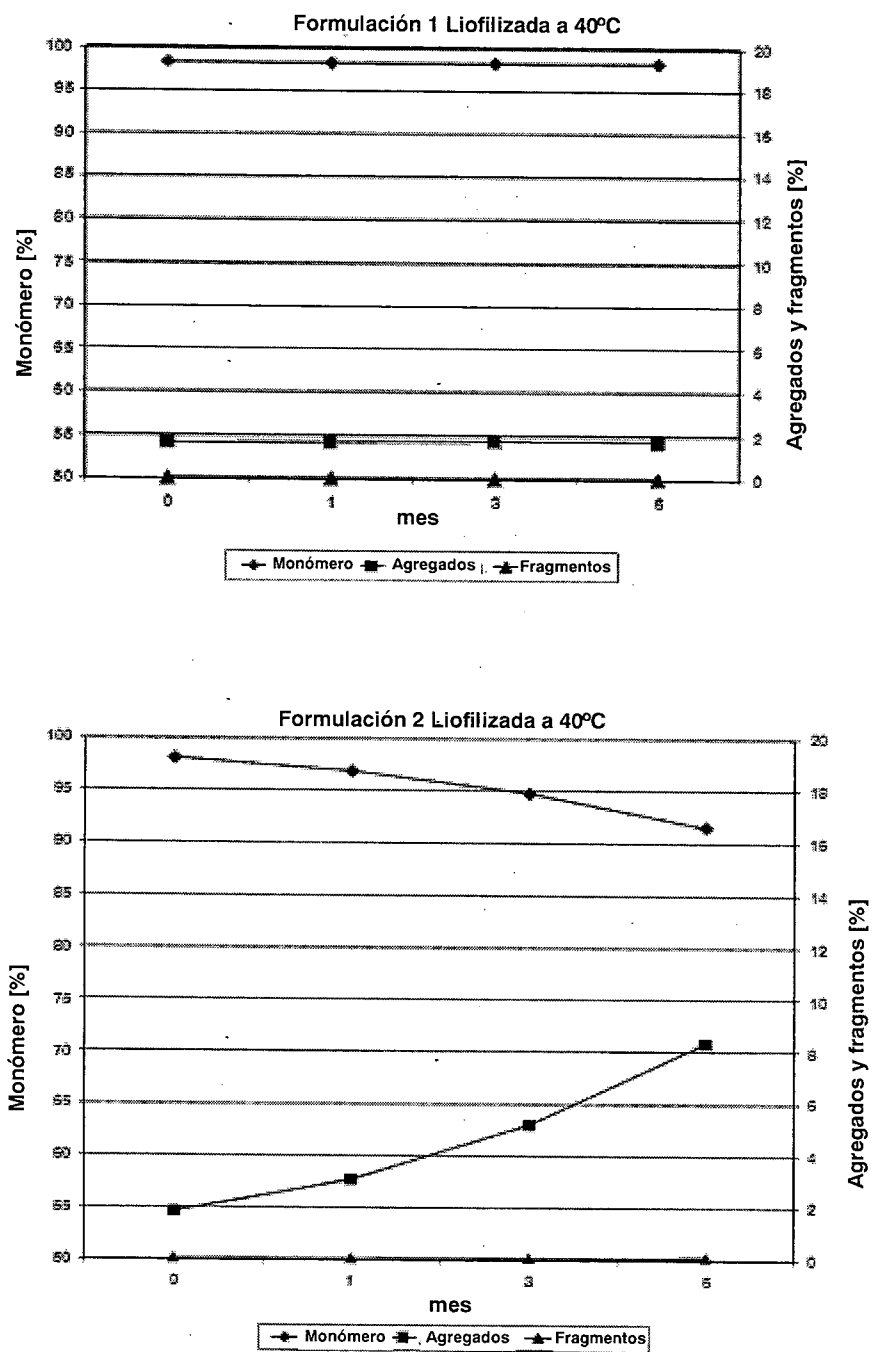
75. El uso de la reivindicación 74, en donde el segundo agente farmacéutico se selecciona del grupo que consiste en las NSAID, los analgésicos, incluyendo los analgésicos opiáceos y los analgésicos atípicos, los anestésicos locales, los bloqueadores nerviosos, los bloqueadores de fenol, los anticuerpos terapéuticos, los esteroides, los anticonvulsivos, los antidepresivos, la capsaicina tópica, los agentes antivirales, los inhibidores de TrkA y los inhibidores de PKC.

**COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO
(NGF)**

RESUMEN

Composiciones estables de anticuerpos anti-NGF y de fragmentos de unión al antígeno de éstos. Su uso en la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos en los que la actividad del NGF es perjudicial, por ejemplo, los trastornos de dolor.

Figura 1



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ABBOTT RESEARCH BV
 <120> COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF)
 <130> PNJ-026PC
 <140> Solicitud nueva
 <141> Concurrentemente con la presente
 <150> 61/314984
 <151> 2010-03-17
 <160> 16
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la 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 la 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 la 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 la 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 la 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 la 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 la 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 la 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 la 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> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de la 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
tcttggaaca gcggagccct gaccagcggg gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc	600
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg acagtgccca gcagcagcct gggcaccaag	660
acctacacct gcaacgtgga ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagggtggag	720
agcaagtacg gccaccctg ccccccattgc ccagcccccg agttcctggg cggaccctcc	780
gtgtttctgt tcccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccgagggtg	840
acctgcgtgg tggtggacgt gagccaggaa gatccagagg tccagttcaa ctggtacgtg	900
gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagtt taacagcacc	960
tacaggggtg tgctcgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac	1020
aagtgaagg tctccaacaa gggcctgccc agctccatcg agaaaaccat cagcaaggcc	1080
aagggccagc cacgggagcc ccaggtgtac accctgccac cctcccagga agagatgacc	1140
aagaaccagg tgctcctgac ctgtctggtg aagggtctct accccagcga catcgccgtg	1200
gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac	1260
agcgacggca gcttcttcct gtacagcagg ctgaccgtgg acaagtccag gtggcaggaa	1320
ggcaacgtct ttagctgcag cgtgatgcac gagggcctgc acaaccacta caccagaag	1380
agcctgtccc tgagcctggg caagtga	1407

<210> 12

<211> 468

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la 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 la 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

325330335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340345350

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355360365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370375380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385390395400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
405410415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420425430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435440445

Lys

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

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

<400> 14
atgagcgtgc ccacccaggt gctgggcctg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc60
gacatccaga tgacccagag ccccagcagc ctgagcgcca gcgtagggcga cagggtgacc120
atcacctgca gggccagcga ggacatctac aacgccctgg cctggtatca gcagaagccc180
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac accgacaccc tgcacaccgg cgtgcccagc240

```

aggttcagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc      300
gaggacttcg ccacctactt ttgccagcac tacttccact accccaggac cttcggccag      360
ggcaccaagg tggagatcaa gaggaccgtg gctgccccca gcgtgttcat cttccccccc      420
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac      480
ccccgggagg 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 la secuencia artificial: Polipéptido sintético"

```

```

<400> 15
Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly 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 la 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		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: 13 / 10 / 5 / AAAA MM DD	
Tipo de Radicación:		Recorrido:	
Entrada: ☐		Salida: ☐	
Traslado: ☐		Convenio: ☐	
Radicador:		Planilla:	

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA

RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:

Fecha: 13 / 10 / 5 /
AAAA MM DD

Recorrido:

Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador:

Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	12-175503-	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Observaciones:

El cd Anexo Contiene un total de 3 Archivos,
3 en formato pdf, los cuales fueron procesados.

FO/PO 56 CD.

713 dda



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 A61K 39/395, C07K 16/18, C07K 16/22, C07K 16/28

(71) Solicitante (s) ABBOTT RESEARCH B.V.

(72) Inventor (es) FRAUNHOFER, Wolfgang; CHARI, Ravi; KUMAR, Vineet; SAEDLER, Rainer; SIEDLER, Michael; STINE, William, B.; WEBER, Carsten

(74) Apoderado DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

(30)	Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
			61/314,984		2010-03-17		US

(85) Fecha inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: 16/03/2011

No. de solicitud: PCT/US2011/028659

(87) Publicación internacional

Fecha: 22/09/2011

Nº publicación: WO/2011/116090 A1

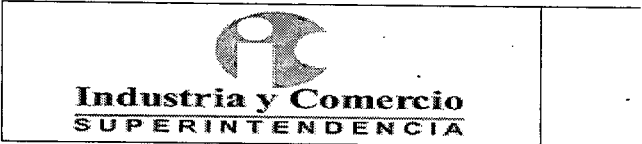
(54) Título: COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF)

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ___ Patente de Invención ___ Patente modelo de utilidad <u>X</u> PCT
---	--

(21) No. De solicitud	(51) int. Cl: A61K 39/395, C07K 16/18, C07K 16/28, C07K 16/22
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) ABBOTT RESEARCH B.V.
(30) Prioridad	(72) Interventor (es) FRAUNHOFER, Wolfgang
(31) No. Prioridad 61/314,984	CHARI, Ravi
(32) Fecha 2010-03-17	KUMAR, Vineet
(33) País US	SAEDLER, Rainer
	SIEDLER, Michael
	STINE, William, B.
	WEBER, Carsten
(54) Título	(74) Apoderado (s) DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF)	
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	(87) Publicación internacional
Fecha de presentación de la solicitud 16/03/2011	Fecha 22/09/2011
No. de solicitud PCT/US2011/028659	No. Publicación WO/2011/116090 A1

Resumen reivindicación (es):

- Una composición farmacéutica que comprende
 - un anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso (NGF) o un fragmento de unión al antígeno de éste;
 - un amortiguador de histidina en una concentración de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 60 mM; y
 - polisorbato 80 en una concentración de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,1%;
 donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende histidina aproximadamente entre 10 y 30 mM
- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el pH es de aproximadamente 5,5.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la composición comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,02% de polisorbato 80.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la composición también comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg/ml de un poliol.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste en el sorbitol y el manitol.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde el poliol es manitol.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en donde la composición comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 mg/ml de manitol.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la composición también comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 mg/ml de un azúcar.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en donde el azúcar es la sacarosa
- La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde la composición comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70 mg/ml de sacarosa.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición no comprende un poliol o un azúcar.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición no comprende metionina.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la concentración del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de éste es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 240 mg/ml.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la concentración del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de éste es de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 120 mg/ml.
- La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y 13-15, en donde la relación molar de (a) un anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, a (b) un poliol, azúcar o una combinación de los mismos, es mayor que 1:1400.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende
 - aproximadamente 20 mg/ml del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de éste;
 - histidina aproximadamente 15 mM; y
 - aproximadamente 0,01% de polisorbato 80;
 donde el pH de la formulación es de aproximadamente 5,5.
- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende
 - aproximadamente 60 mg/ml del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de éste;
 - histidina aproximadamente 30 mM; y
 - aproximadamente 0,02% de polisorbato 80;...



No. 12-175503- -00000-0000

Fecha: 2012-10-05 14:44:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 56

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 Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo 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 _____

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ABBOTT RESEARCH BV

<120> COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF)

<130> PNJ-026PC

<140> Solicitud nueva

<141> Concurrentemente con la presente

<150> 61/314984

<151> 2010-03-17

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la 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 la 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 la 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 la 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 la 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 la 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 la 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 la 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
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
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
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys												

325

<210> 10

<211> 327

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la 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

atggaatgga gctgggtggt cctgtttcttc ctgagcgtga ccaccggcgt gcacagcgag	60
gtgcagctgg tcgagagcgg cggagggctg gtgcagccag gcggcagcct gaggtgtcc	120
tgcgccgcca gcggcttcag cctgaccaac aacaacgtga actgggtgcg gcaggcccca	180
ggcaagggcc tggaatgggt gggcggcgtg tgggccgggg gagccaccga ctacaacagc	240
gccctgaaga gcaggttcac catcagcagg gacaacagca agaaccgc ctacctgag	300
atgaacagcc tgagggccga ggaccgcgc 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 gaggggtggag	720
agcaagtacg gccaccctg ccccccattgc ccagcccccg agttcctggg cggaccctcc	780
gtgtttctgt tccccccaa gcccaaggac accctgatga tcagcaggac ccccgagggtg	840
acctgcgtgg tgggtggacgt gagccaggaa gatccagagg tccagttcaa ctggtacgtg	900
gacggcgtgg aggtgcacaa cgccaagacc aagcccagag aggaacagtt taacagcacc	960
tacaggggtg tgtccgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac	1020
aagtgaagg tctccaacaa gggcctgccc agctccatcg agaaaaccat cagcaaggcc	1080
aagggccagc cacgggagcc ccaggtgtac accctgccac cctcccagga agagatgacc	1140
aagaaccagg tgtccctgac ctgtctggtg aagggtttct accccagcga catcgccgtg	1200
gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaaga ccaccccccc agtgctggac	1260
agcgacggca gctttcttct gtacagcagg ctgaccgtgg acaagtccag gtggcaggaa	1320
ggcaacgtct ttagctgcag cgtgatgcac gaggccctgc acaaccacta caccagaag	1380
agcctgtccc tgagcctggg caagtga	1407

<210> 12

<211> 468

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la 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 la 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 115	Gln	Gly 115	Thr	Leu	Val	Thr	Val 120	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr 125	Lys	Gly	Pro
Ser 130	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro 135	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr 140	Ser	Glu	Ser	Thr
Ala 145	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu 150	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe 155	Pro	Glu	Pro	Val	Thr 160
Val	Ser	Trp	Asn	Ser 165	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser 170	Gly	Val	His	Thr	Phe 175	Pro
Ala	Val	Leu	Gln 180	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr 185	Ser	Leu	Ser	Ser	Val 190	Val	Thr
Val	Pro	Ser 195	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr 200	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys 205	Asn	Val	Asp
His	Lys 210	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys 215	Val	Asp	Lys	Arg	Val 220	Glu	Ser	Lys	Tyr
Gly 225	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro 230	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu 235	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro 240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe 245	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys 250	Asp	Thr	Leu	Met	Ile 255	Ser
Arg	Thr	Pro	Glu 260	Val	Thr	Cys	Val	Val 265	Val	Asp	Val	Ser	Gln 270	Glu	Asp
Pro	Glu	Val 275	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr 280	Val	Asp	Gly	Val	Glu 285	Val	His	Asn
Ala	Lys 290	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu 295	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser 300	Thr	Tyr	Arg	Val
Val 305	Ser	Val	Leu	Thr	Val 310	Leu	His	Gln	Asp	Trp 315	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu 320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys


```

aggttcagcg gcagcggctc cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc      300
gaggacttcg ccacctactt ttgccagcac tacttccact accccaggac cttcggccag      360
ggcaccaagg tggagatcaa gaggaccgtg gctgccccca gcgtgttcat cttccccccc      420
agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac      480
ccccgggagg 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 la 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 la 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

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 September 2011 (22.09.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/116090 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2011/028659

(22) International Filing Date:

16 March 2011 (16.03.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/314,984 17 March 2010 (17.03.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **ABBOTT RESEARCH B.V.** [NL/NL]; Meeuwenlaan 4, P.O.Box 365, NL-8000 AJ Zwolle (NL).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **FRAUNHOFER, Wolfgang** [DE/US]; 6290 Murifield Drive, Gurnee, IL 60031 (US). **CHARI, Ravi** [US/US]; 76 Harley Drive, Apt. 2, Worcester, MA 01616 (US). **KUMAR, Vineet** [IN/US]; 126 Courtyard Lane, Storrs, CT 06268 (US). **SAEDLER, Rainer** [DE/DE]; Rheindammstrasse 30, 68163 Mannheim (DE). **SIEDLER, Michael** [DE/US]; 86 Marlborough St. #9, Boston, MA 02116 (US). **STINE, William, B.** [US/US]; 18 Quail Hollow Drive, Shrewsbury, MA 01545 (US). **WEBER, Carsten** [DE/DE]; Rietburgstr. 29, D-67133 Maxdorf (DE).

(74) Agents: **REMILLARD, Jane, E.** et al.; Nelson Mullins Riley & Scarborough LLP, One Post Office Square, Boston, MA 02109-2127 (US).

(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, RS, 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: ANTI-NERVE GROWTH FACTOR (NGF) ANTIBODY COMPOSITIONS

(57) Abstract: The present invention relates to stable compositions of anti-NGF antibodies, and antigen-binding fragments thereof, and their uses in the prevention and/or treatment of various diseases and disorders in which NGF activity is detrimental, e.g., pain disorders.



WO 2011/116090 A1

ANTI-NERVE GROWTH FACTOR (NGF) ANTIBODY COMPOSITIONS

Related Application

5 This application claims priority to U.S. Provisional Patent Application No. 61/314,984, filed on March 17, 2010, the contents of which are incorporated herein by reference.

Background of the Invention

10

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; Fahnstock, 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).

Earlier formulations containing anti-NGF antibodies (*e.g.*, PG110) have suffered from physical instability of the antibody in the formulation, as reflected by severe visible particle formation and precipitation phenomena. Thus, there is a need in the art for formulations containing anti-NGF antibodies which maintain physical stability and which reduce particle formation susceptibility.

Summary of the Invention

20

The present invention, is based, at least in part, on the discovery of novel formulations containing anti-NGF antibodies (*e.g.*, the humanized PG110 antibody) which formulations are physically stable and do not suffer from particle formation susceptibilities.

25

Accordingly, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising: (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody, or antigen binding fragment thereof, (b) a histidine buffer at a concentration of about 5 to about 60 mM; and (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to about 0.1%; wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0. In certain embodiments, the composition further comprises a sugar and/or polyol, such as those described herein. In other embodiments, the composition does not comprise a polyol or sugar. In yet other embodiments, the composition does not comprise methionine.

30

In certain embodiments, the present invention provides a pharmaceutical compositions consisting of , or consisting essentially of, (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody, or antigen binding fragment thereof, (b) a histidine buffer at a concentration of about 5 to about 60 mM; and (c) polysorbate 80 at a concentration of

35

about 0.01% to about 0.1%; wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.

In certain embodiments, the present invention provides a pharmaceutical compositions consisting of , or consisting essentially of, (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody, or antigen binding fragment thereof, (b) a histidine buffer at a concentration of about 5 to about 60 mM; (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to about 0.1%; and (d) a polyol and/or a sugar; wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.

In certain embodiments, the present invention provides a pharmaceutical compositions consisting of , or consisting essentially of, (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody, or antigen binding fragment thereof, (b) a histidine buffer at a concentration of about 5 to about 60 mM; (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to about 0.1%; and (d) a polyol; wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.

In certain embodiments, the present invention provides a pharmaceutical compositions consisting of , or consisting essentially of, (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody, or antigen binding fragment thereof, (b) a histidine buffer at a concentration of about 5 to about 60 mM; (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to about 0.1%; and (d) a sugar; wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.

In certain embodiments, the pharmaceutical composition of the invention is a liquid pharmaceutical composition. In other embodiments, the pharmaceutical composition is suitable for lyophilization. Accordingly, the invention further provides lyophilized pharmaceutical compositions comprising (a) about 1 to about 240 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof; (b) about 1 to about 10 mg of histidine; and (c) about 0.1 to about 0.4 mg of polysorbate 80. In certain embodiments, the lyophilized composition further comprises a sugar and/or polyol. In other embodiments, the lyophilized composition does not comprise a polyol or sugar.

In certain embodiments, the present invention provides a pharmaceutical compositions consisting of , or consisting essentially of, (a) about 1 to about 240 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof; (b) about 1 to about 10 mg of histidine; and (c) about 0.1 to about 0.4 mg of polysorbate 80.

In other embodiments, the present invention provides a pharmaceutical compositions consisting of , or consisting essentially of, (a) about 1 to about 240 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof; (b) about 1 to about 10 mg of histidine; (c) about 0.1 to about 0.4 mg of polysorbate 80; and (d) about 1 to about 100 mg of a polyol and/or about 1 to about 100 mg of a sugar.

In other embodiments, the present invention provides a pharmaceutical compositions consisting of , or consisting essentially of, (a) about 1 to about 240 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof; (b) about 1 to about 10 mg of histidine; (c) about 0.1 to about 0.4 mg of polysorbate 80; and (d) about 1 to about 100 mg of a polyol.

In still other embodiments, the present invention provides a pharmaceutical compositions consisting of , or consisting essentially of, (a) about 1 to about 240 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof; (b) about 1 to about 10 mg of histidine; (c) about 0.1 to about 0.4 mg of polysorbate 80; and (d) about 1 to about 100 mg of a sugar. In certain embodiments, the anti-NGF antibody, or antigen-binding portion thereof, binds to human NGF. In other embodiments, the antibody, or antigen-binding portion thereof, comprises a human IgG4 constant region, wherein the human IgG4 constant region comprises a hinge region mutation. Preferably, the hinge region mutation in the IgG4 constant region comprises mutation of serine at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 (which shows the wild type amino acid sequence of the human IgG4 constant region). More preferably, the serine at 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.

A preferred anti-NGF antibody contained in the compositions 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. In another embodiment, the invention provides compositions containing 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. 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.

In still other embodiments, the antibody, or antigen-binding portion thereof, 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 still other embodiments, the antibody, or antigen-binding portion thereof, is selected from the group consisting of a monoclonal antibody, a human antibody, a humanized antibody, a chimerical antibody, a CDR-grafted antibody, a Fab, a Fab', a F(ab')₂, a Fv, a disulfide linked Fv, a scFv, a single domain antibody, a diabody, a multispecific antibody, a dual specific antibody, a bispecific antibody, or an antibody in which the potential T cell epitopes have been eliminated. In a further embodiment, the antibody, or antigen-binding portion thereof, is humanized.

In a particularly preferred embodiment, the invention provides compositions containing 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 cynomolgus monkey of at least 15 days, more preferably of at least 21 days, and wherein the antibody alleviates pain for a duration of at least about one week to about twelve weeks after administration of a single dose the antibody to a subject.

The invention also relates to methods for inhibiting NGF activity in a human subject suffering from an NGF related disease or condition by administering to the human subject a pharmaceutical composition of the invention. In other embodiments, a second pharmaceutical agent, as describe herein, is administered to the subject. In certain embodiments, the NGF related disease or condition is pain. 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 spondylitis, 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. 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.

The pharmaceutical composition of the invention 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.

Kits or articles of manufacture comprising a pharmaceutical composition of the invention are also provided herein.

30 **Brief Description of the Drawings**

Figure 1 is a graphic comparison of the stability of Formulation 1 and Formulation 2 over time.

Detailed Description of the Invention

35 The present invention pertains to improved compositions (*e.g.*, pharmaceutical compositions) of anti-NGF antibodies, or antigen-binding portions thereof, having improved stability. The compositions of the present invention generally comprise an anti-NGF antibody, or antigen-binding fragment thereof, a suitable buffer (*e.g.*, a

histidine buffer), a suitable excipient (*e.g.*, polysorbate 80), and having a pH of about 5.0 to about 6.0. The compositions of the present invention may be liquid, suitable for lyophilization, and/or lyophilized.

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

I. Definitions

The articles "a" and "an" are used herein to refer to one or to more than one (*i.e.*, to at least one) of the grammatical object of the article. By way of example, "an
10 element" means one element or more than one element.

The term "pharmaceutical formulation" refers to a preparation that is in such form as to permit the biological activity of the active ingredient(s) to be unequivocally effective, and that contains no additional components that are significantly toxic to the subjects to which the formulation would be administered.

15 The phrase "pharmaceutically acceptable carrier" is art recognized to include a pharmaceutically acceptable material, composition or vehicle, suitable for administration to mammals such as humans. Such carriers include liquid or solid filler, diluent, excipient, solvent or encapsulating material, involved in carrying or transporting the subject agent from one organ, or portion of the body, to another organ, or portion of the
20 body. Each carrier must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients of the composition and not injurious to, or impacting the safety of, the human subject.

"Buffer" refers to a buffered solution that resists changes in pH by the action of its acid-base conjugate components. The buffers of the invention have a pH in the range
25 from about 4 to about 8. Examples of buffers that will control pH in this range include phosphate, acetate (*e.g.*, sodium acetate), succinate (*e.g.*, sodium succinate), gluconate, glutamate, histidine, citrate, and other organic acid buffers.

The term "excipient" refers to an agent that may be added to a composition to provide a desired consistency, *e.g.*, by altering the bulk properties, to improve stability,
30 and/or to adjust osmolality. Examples of commonly used excipients include, but are not limited to, sugars, polyols, amino acids, surfactants, and polymers. "Pharmaceutically acceptable excipients" (*e.g.*, vehicles, additives) are those that can reasonably be administered to a mammalian subject, *e.g.*, human, to provide an effective dose of the active ingredient employed.

35 As used herein, a "polyol" is a substance with multiple hydroxyl groups, and includes sugar alcohols and sugar acids. Particular polyols have a molecular weight that is less than about 600 D (*e.g.*, in the range from about 120 to about 400 D). Non-limiting examples of polyols include fructose, mannose, maltose, lactose, arabinose,

xylose, ribose, rhamnose, galactose, glucose, sorbose, melezitose, raffinose, mannitol, xylitol, erythritol, threitol, sorbitol, glycerol, L-gluconate and metallic salts thereof.

A "sugar" is a carbohydrate with a characteristically sweet taste. Sugars may be classified as monosaccharides, disaccharides, and polysaccharides. "Monosaccharides"

5 are the simple sugars, *e.g.*, fructose, levulose, glucose, and dextrose, or grape sugar.

"Disaccharides" include lactose or milk sugar, maltose or malt sugar, crystalline disaccharide, sucrose, and trehalose (also known as mycose or tremalose). Upon hydrolysis, a disaccharide molecule yields two monosaccharide molecules.

"Polysaccharides" include such substances as cellulose, dextrin, glycogen, and starch.

10 Polysaccharides are polymeric compounds made up of the simple sugars and can be hydrolyzed to yield simple sugars. The disaccharides are sometimes grouped with the simpler polysaccharides (usually those made up of three or four simple sugar units) to form a class of carbohydrates called "oligosaccharides".

A "sugar" may also be classified as a "reducing sugar" or a "non-reducing
15 sugar". The reducing sugars are distinguished by the fact that because of their free, or potentially free, aldehyde or ketone groups they possess the property of readily reducing alkaline solutions of many metallic salts, such as those of copper, silver, bismuth, mercury, and iron. The reducing sugars include, *e.g.*, maltose, lactose, cellobiose, gentiobiose, melibiose, and turanose. Non-limiting examples of nonreducing sugars
20 include sucrose, trehalose, raffinose, melezitose, stachyose, and verbascose.

The term "surfactant" generally includes those agents that protect a protein in a composition from air/solution interface-induced stresses and solution/surface induced-stresses. For example, a surfactant may protect the protein from aggregation. Suitable surfactants may include, *e.g.*, polysorbates, polyoxyethylene alkyl ethers such as Brij
25 35.RTM.; or poloxamers, such as Tween 20, Tween 80, or poloxamer 188. Preferred detergents are polyoxyethylene alkyl ethers, *e.g.*, Brij 35.RTM., Cremophor A25, Sympatens ALM/230; polysorbates/Tweens, *e.g.*, Polysorbate 20, Polysorbate 80, Mirj, and Poloxamers, *e.g.*, Poloxamer 188, Poloxamer 407 and Tweens, *e.g.*, Tween 20 and Tween 80.

30 A "stable" composition is one in which the active ingredient, *e.g.*, an antibody, therein essentially retains its physical stability and/or chemical stability and/or biological activity during the manufacturing process and/or upon storage. Various analytical techniques for measuring protein stability are available in the art and are reviewed in Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc.,
35 New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90. ,

An antibody "retains its physical stability" in a pharmaceutical composition if it shows substantially no signs of, *e.g.*, aggregation, precipitation and/or denaturation upon visual examination of color and/or clarity, or as measured by UV light scattering or by

size exclusion chromatography. Aggregation is a process whereby individual protein molecules or complexes associate covalently or non-covalently to form aggregates. Aggregation can proceed to the extent that a visible precipitate is formed. The physical stability of a pharmaceutical composition containing an anti-NGF antibody may be determined, for example, according to the percentage of monomer protein in the solution, with a low percentage (e.g., less than 3%) of degraded (e.g., fragmented) and/or aggregated protein indicating that the composition is stable.

An antibody "retains its chemical stability" in a pharmaceutical composition of the invention, if the chemical stability at a given time is such that the antibody is considered to still retain its biological activity as defined below. Chemical stability can be assessed by, e.g., detecting and quantifying chemically altered forms of the antibody. Chemical alteration may involve size modification (e.g., clipping) that can be evaluated using size exclusion chromatography, SDS-PAGE and/or matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry (MALDI/TOF MS). Other types of chemical alteration include charge alteration (e.g., occurring as a result of deamidation or oxidation), which can be evaluated by, for example, ion-exchange chromatography.

An antibody "retains its biological activity" in a pharmaceutical composition of the invention, if the antibody in a pharmaceutical composition is biologically active for its intended purpose. For example, biological activity is retained if the biological activity of the antibody in the pharmaceutical composition is within about 30%, about 20%, or about 10% (within the errors of the assay) of the biological activity exhibited at the time the pharmaceutical composition was prepared (e.g., as determined in an antigen binding assay). Biological activities of the anti-NGF antibodies contained within the formulations of the invention include, but are not limited to, binding to human NGF, inhibiting binding of NGF to TrkA or p75^{NTR}, inhibiting NGF-dependent proliferation of TF-1 cells, inhibiting NGF-dependent survival and differentiation of neurons and inhibiting NGF-dependent pain transduction. The term "activity" further includes activities such as the binding specificity/affinity of an antibody for an antigen, for example, an anti-NGF antibody that binds to an NGF antigen.

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 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 mouse 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:

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

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 "inhibition" as used herein, refers to any statistically significant
 5 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
 10 portion") or single chains thereof that retains the ability to specifically bind to an antigen (*e.g.*, NGF). In a full-length antibody, each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as HCVR or VH) 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
 15 LCVR or VL) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The VH and VL 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 VH and VL is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-
 20 terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, and 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 (C1q) of the
 25 classical complement system. Immunoglobulin molecules can be of any type (*e.g.*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA and IgY), class (*e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2) or subclass.

The term "antigen-binding portion" or "antigen-binding fragment" of an antibody (or simply "antibody portion") refers to one or more fragments of an antibody that retain
 30 the ability to specifically bind to an antigen (*e.g.*, NGF). Such antibody embodiments may also be bispecific, dual specific, or multi-specific formats; specifically binding to two or more different antigens. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) a F(ab')₂ fragment, a
 35 bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody, (v) a

dAb fragment (Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-546, Winter et al., PCT publication WO 90/05144 A1), which comprises a single variable domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using
5 recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see *e.g.*, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426 and Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Other forms of single chain antibodies, such as diabodies are also encompassed. Diabodies are bivalent,
10 bispecific antibodies in which VH and VL domains are expressed on a single polypeptide chain, but using a linker that is too short to allow for pairing between the two domains on the same chain, thereby forcing the domains to pair with complementary domains of another chain and creating two antigen binding sites (see *e.g.*, Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak et al. (1994)
15 *Structure* 2:1121-1123). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody as is well known in the art (Kontermann and Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag, New York, 790 (ISBN 3-540-41354-5).

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

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
25 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
30 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
35 (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.

In an embodiment, the term "humanized antibody" is an antibody or a variant, derivative, analog or fragment thereof which immunospecifically binds to an antigen of interest and which comprises a framework (FR) region having substantially the amino acid sequence of a human antibody and complementary determining regions (CDRs) having substantially the amino acid sequence of a non-human antibody. As used herein, the term "substantially" in the context of a CDR refers to a CDR having an amino acid sequence at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 98% or at least 99% identical to the amino acid sequence of a non-human antibody CDR. A humanized antibody comprises substantially all of at least one, and typically two, variable domains (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin (*i.e.*, donor antibody) and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. In an embodiment, a humanized antibody also comprises at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. In some embodiments, a humanized antibody contains both the light chain as well as at least the variable domain of a heavy chain. The antibody also may include the CH1, hinge, CH2, CH3, and CH4 regions of the heavy chain. In an embodiment, a humanized antibody only contains a humanized light chain. In another embodiment, a humanized antibody only contains a humanized heavy chain. In a particular embodiment, a humanized antibody only contains a humanized variable domain of a light chain and/or humanized heavy chain. The humanized antibody can be selected from any class of immunoglobulins, including IgM, IgG, IgD, IgA and IgE, and any isotype, including without limitation IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. The humanized antibody may comprise sequences from more than one class or isotype, and particular constant domains may be selected to optimize desired effector functions using techniques well known in the art.

The term "epitope" includes any x determinant (*e.g.*, polypeptide) capable of specific binding to an immunoglobulin. In certain embodiments, epitope determinants include chemically active surface groupings of molecules such as amino acids, sugar side chains, phosphoryls, sulfonyls, and, in certain embodiments, may have specific three dimensional structural characteristics, and/or specific charge characteristics. An epitope is a region of an antigen that is bound by an antibody. In certain embodiments, an antibody is said to specifically bind an antigen when it preferentially recognizes its target antigen in a complex mixture of proteins and/or macromolecules.

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, for example, obtained in a titration measurement at equilibrium, or by dividing the dissociation rate constant (K_{off}) by the association rate constant (K_{on}). The association rate constant (K_{on}), the dissociation rate constant (K_{off}), and the equilibrium dissociation constant (K) are used to represent the binding affinity of an antibody to an antigen. Methods for determining association and dissociation rate constants are well known in the art. Fluorescence-based techniques offer high sensitivity and the ability to examine samples in physiological buffers at equilibrium. Other experimental approaches and instruments such as a BIAcore® (biomolecular interaction analysis) assay can be used (*e.g.*, instrument available from BIAcore International AB, a GE

Healthcare company, Uppsala, Sweden). Additionally, a KinExA® (Kinetic Exclusion Assay) assay, available from Sapidyn Instruments (Boise, Idaho) can also be used.

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.*,
 5 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 terms " K_{ass} ", " K_a " and " K_{on} ", as used herein, are intended to refer to the
 10 association rate constant for the association of an antibody into the antibody/antigen complex. This value indicates the binding rate of an antibody to its target antigen or the rate of complex formation between an antibody and antigen as is shown by the equation below:



15 The terms " K_{diss} ", " K_d " and " K_{off} ", as used herein, are intended to refer to the dissociation rate constant for the dissociation of an antibody from the antibody/antigen complex. This value indicates the dissociation rate of an antibody from its target antigen or separation of Ab-Ag complex over time into free antibody and antigen as shown by the equation below:



20 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.

25 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.

30 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"
 35 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 etiology, 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. Pharmaceutical Compositions of the Invention

The present invention provides liquid and lyophilized pharmaceutical compositions comprising an anti-NGF antibody or antigen binding fragment thereof, having improved properties as compared to art-recognized compositions. The compositions of the invention are able to maintain solubility and stability of the anti-NGF antibody or antigen binding fragment thereof, *e.g.*, during manufacturing, storage, and/or repeated freeze/thaw processing steps or extended exposure to increased air-liquid interfaces (*e.g.*, do not show significant opalescence, aggregation, or precipitation). For example, the compositions of the invention maintain a low level of protein aggregation (*i.e.*, less than 3%), despite containing high amounts (*e.g.*, about 10 to about 240 mg/mL), of the antibody or antigen binding fragment thereof. The compositions of the invention also maintain a low viscosity within ranges suitable for subcutaneous injection, despite containing high amounts (*e.g.*, about 10 to about 240

mg/mL), of the antibody. Furthermore, the compositions of the invention maintain solubility, maintain a low viscosity suitable for subcutaneous or intravenous injection, and maintain stability over a pH range of, *e.g.*, about pH 5.0 to about pH 6.0. Thus, the antibody compositions of the invention overcome a number of known challenges for
5 antibody compositions, including stability, viscosity, turbidity, and physical degradation challenges.

Accordingly, in one aspect, the pharmaceutical compositions comprise an anti-NGF antibody or antigen binding fragment thereof, a buffer and an excipient which are sufficient to maintain stability of the anti-NGF antibody or antigen binding fragment
10 thereof in liquid and/or lyophilized form.

Anti-NGF antibodies, and antigen-binding fragments thereof, that can be used in the compositions of the invention and methods of making such antibodies, and antigen-binding fragments thereof, are described in detail herein. The amount of the antibody present in the composition is determined, for example, by taking into account the desired
15 dose, volume(s) and mode(s) of administration. In certain embodiments of the invention, the compositions of the invention, *e.g.*, liquid and/or lyophilized compositions (upon reconstitution) comprise a protein concentration of about 10 to about 240 mg/mL, about 20 to about 120 mg/mL, about 40 to about 240 mg/mL, about 50-150 mg/mL, about 15 to about 75 mg/mL, or about 10 to about 20 mg/mL of the anti-human NGF
20 antibodies, or antigen-binding fragments thereof. Although the preferred embodiments of the invention are compositions comprising high protein concentrations, it is also contemplated that the compositions of the invention may comprise an antibody concentration between about 1 mg/mL and about 240 mg/mL, between about 1 mg/mL and about 150 mg/mL or between about 50 mg/mL and about 150 mg/mL is between
25 about 30 mg/mL and about 50 mg/mL. In one embodiment of the invention, the concentration of the antibody is about 100 mg/mL. In one embodiment of the invention, the concentration of the antibody is about 60 mg/mL. In one embodiment of the invention, the concentration of the antibody is about 30 mg/mL. In another embodiment, the concentration of the antibody is about 20 mg/mL. In another
30 embodiment, the concentration of the antibody is about 10 mg/mL. In another embodiment of the invention, the compositions, comprise a concentration of the antibody of about 55 mg/mL.

Ranges intermediate, *e.g.*, to the above-recited ranges, *e.g.*, 75-90 mg/mL, are also intended to be part of this invention. For example, ranges of values using a
35 combination of any of the above-recited values as upper and/or lower limits are intended to be included. In addition, concentrations of anti-NGF antibody intermediate to the above recited amounts and concentrations are also intended to be part of this invention (*e.g.*, about 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,

24,25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 or about 240 mg/mL).

In some embodiments of the invention, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 1-100 mg, 1-75 mg, 1-55 mg, 1-30 mg, 1-20 mg, 1-10 mg, 10-20 mg, 15-75 mg, 100-150 mg, 110-150 mg, 100-140 mg, 110-140 mg, 120-140 mg, 130-140 mg of the anti-NGF antibody. In other embodiments, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 40-240, 40-200, 40-180, 40-160, 40-140, 40-120 mg, 45-100 mg, 50-80 mg, or 55-70 mg of the antibody. In one embodiment, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 10 mg of the antibody. In another embodiment, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 20 mg of the antibody.

Ranges intermediate to the above-recited ranges, *e.g.*, 132-138, or 55-65, are also intended to be part of this invention. For example, ranges of values using a combination of any of the above-recited values as upper and/or lower limits are intended to be included. In addition, amounts and concentrations of anti-NGF antibody intermediate to the above recited amounts and concentrations are also intended to be part of this invention (*e.g.*, about 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 134.1, 134.2, 134.3, 134.4, 134.5, 134.6, 134.7, 134.8, 134.9, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, or about 150 mg of the antibody).

Buffers used in the pharmaceutical compositions of the invention are those suitable to maintaining the pH of the composition in a range from about 4.0 to about 8.0, from about 5.0 to about 7.0, from about 5.0 to about 6.5, from about 5.5 to about 7.0.

Preferably, the buffer maintains the pH of the pharmaceutical composition of the invention in the range from about 5.0 to about 6.0, from about 6.0 to about 7.0, from about 5.5 to about 6.0, from about 6.0 to about 6.5, from about 5.75 to about 6.25 and from about 5.25 to about 5.75. In one embodiment, the pH of the compositions of the invention is about 6.0. In one embodiment, the pH of the compositions of the invention is about 5.5. In one embodiment, the pH of the compositions of the invention is about 5.0. Ranges and values intermediate to the above-recited pHs are also intended to be part of this invention (*e.g.*, pHs of 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, or 6.4). Ranges of values using a combination of any of the above-recited values as upper and/or lower limits are intended to be included..

Examples of buffers that will control the pH within the range of about 5.5 to about 7.0 include phosphate, acetate (*e.g.*, sodium acetate), succinate (*e.g.*, sodium succinate), arginine, gluconate, glutamate, histidine, citrate and other organic acid buffers.

In one embodiment, the buffer is histidine. In certain embodiments of the invention, the concentration of the histidine in the composition is about 1-100 mM, about 1-30 mM, about 5-30 mM, about 10-30 mM, about 30-60 mM, about 30-40 mM, about 10-50 mM, about 15-60 mM, about 15-45 mM, about 15-30 mM, about 15-25 or about 15-20 mM. In one embodiment, the concentration of the histidine in the composition is about 20 mM. In another embodiment, the concentration of the histidine in the composition is about 15 mM. In another embodiment, the concentration of the histidine in the composition is about 30 mM. Concentrations and ranges of histidine intermediate to the above recited concentrations are also intended to be part of this invention (*e.g.*, about 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, or about 100 mM of histidine). Ranges of concentrations using a combination of any of the above-recited values as upper and/or lower limits are intended to be included.

In other embodiments of the invention, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 1-10 mg of histidine, or about 2-5 mg histidine. In one embodiment, the compositions comprise about 6 mg, *e.g.*, about 5.7 mg, of histidine. In one embodiment, the compositions comprise about 5 mg, *e.g.*, about 4.7 mg, of histidine. In one embodiment, the compositions comprise about 2-3 mg of histidine. Amounts and ranges of histidine intermediate to the above-recited amounts are also intended to be part of this invention (*e.g.*, about 1, 1.5, 2, 2.2, 2.3, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, or about 10 mg of histidine). Ranges of

amounts using a combination of any of the above-recited values as upper and/or lower limits are intended to be included.

A detergent or surfactant may also be added to the antibody compositions of the invention as an excipient. Exemplary detergents include nonionic detergents such as polysorbates (*e.g.*, polysorbates 20, 80, etc.) or poloxamers (*e.g.*, poloxamer 188). The amount of detergent added is such that it reduces aggregation of the formulated antibody and/or minimizes the formation of particulates in the composition and/or reduces adsorption. Suitable surfactants may include, *e.g.*, polysorbates, polyoxyethylene alkyl ethers such as Brij 35.RTM.; or poloxamers, such as Tween 20, Tween 80, or poloxamer 188. Preferred detergents are polyoxyethylene alkyl ethers, *e.g.*, Brij 35.RTM., Cremophor A25, Sympatens ALM/230; polysorbates/Tweens, *e.g.*, Polysorbate 20, Polysorbate 80, Mirj, and Poloxamers, *e.g.*, Poloxamer 188, Poloxamer 407 and Tweens, *e.g.*, Tween 20 and Tween 80.

In a preferred embodiment of the invention, the composition includes a surfactant which is a polysorbate. In another preferred embodiment of the invention, the composition contains the detergent polysorbate 80. In one embodiment, the composition contains between about 0.01 and about 2.0 mg/mL, about 0.01 to about 1 mg/mL, about 0.05 to about 2.0 mg/mL, about 0.05 to about 1.0 mg/mL, about 0.05 to about 0.5 mg/mL, about 0.05 to about 0.1 mg/mL of polysorbate 80. In one embodiment, the composition comprises about 1 mg/mL of polysorbate 80. In another embodiment, the composition comprises about 0.1 mg/mL of polysorbate 80. In yet another embodiment, the composition comprises about 0.05 mg/mL of polysorbate 80. In one embodiment, the composition comprises between about 0.001% and about 0.1%, between about 0.005% and about 0.08%, between about 0.007% and about 0.06%, between about 0.01% and about 0.04%, between about 0.01% and about 0.03%, or between about 0.01% and 0.02% polysorbate 80. In one embodiment, the composition comprises about 0.01% polysorbate 80. In one embodiment, the composition comprises about 0.02% polysorbate 80. In other embodiments of the invention, however, the compositions are essentially free of or do not contain a surfactant, such as Tween or polysorbate.

In certain embodiments of the invention, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, may comprise between about 0.01 and 0.5 mg, *e.g.*, about 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45 or about 0.5 mg of a surfactant. In one embodiment, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 0.20 mg of a surfactant, *e.g.*, polysorbate 80. In one embodiment, the compositions *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 0.10 mg of a surfactant, *e.g.*, polysorbate 80. Ranges and amounts intermediate to the above-recited concentrations and amounts of surfactants are also intended to be part of this invention, *e.g.*, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07,

0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, and 2.0 mg/mL of a surfactant. In addition, ranges of values using a combination of any of the above-recited values as upper and/or lower limits are intended to be included, *e.g.*, 0.04 to 1.8 mg/mL of a surfactant.

5 The compositions of the invention may also comprise a polyol. Polyols useful in the compositions of the invention include, but are not limited to, one or more of trehalose, fructose, mannose, maltose, lactose, arabinose, xylose, ribose, rhamnose, galactose, glucose, sorbose, melezitose, raffinose, mannitol, xylitol, erythritol, threitol, sorbitol, glycerol, L-gluconate and metallic salts thereof.

10 In one embodiment, the polyol is selected from the group consisting of sorbitol, glycerol, trehalose and mannitol or combinations thereof. In one embodiment, the polyol is not mannitol. In certain embodiments, the concentration of the polyol in the compositions of the invention is about 1 to about 100 mg/mL, about 10 to about 90
15 mg/mL, about 20 to about 80 mg/mL, about 30 to about 70 mg/mL, about 40 to about 60 mg/mL, or about 50 to about 60 mg/mL. In other embodiments, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, of the invention comprise a polyol at a concentration of about 10-100 mg, about 10 to about 90 mg/mL, about 20 to about 80 mg/mL, about 30 to about 70 mg/mL, about 40 to about 60 mg/mL, or about 50 to about 60 mg/mL. In other
20 embodiments, the compositions of the invention, *e.g.*, compositions suitable for lyophilization, comprise about 1-50 mg/mL, about 10-30 mg/mL or about 20-25 mg/mL of a polyol.

 In still other embodiments, the compositions of the invention, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 10-120, about, about 20-120, about 30-120, about 40-120, about 50-120, about 60-120, about 10-110, about 10-100, about 10-90, about 10-80,
25 about 10-70 mg of a polyol or combination thereof. Concentrations and ranges of polyols intermediate to the above recited concentrations are also intended to be part of this invention (*e.g.*, about 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66,
30 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, or about 100 mg/mL of polyol). Ranges of concentrations of polyols using a combination of any of the above-recited values as upper and/or lower limits are intended to be included, *e.g.*, 35-70 mg/ml of polyol.

 In one embodiment, a suitable polyol for use in the compositions of the invention
35 is a sugar alcohol, *e.g.*, sorbitol. The compositions of the invention may comprise about 20-60 mg/mL, about 30-60 mg/mL, about 20-50 mg/mL, or about 35-45 mg/mL of sorbitol. In one embodiment, the compositions comprise about 40 mg/mL of sorbitol.

In another embodiment, a suitable polyol for use in the compositions of the invention is mannitol. The compositions of the invention may comprise about 1-50 mg/mL, about 10-40 mg/mL, about 20-30 mg/mL, about 20-25 mg/mL of mannitol. In one embodiment, the compositions comprise about 20 mg/mL of mannitol. In one
5 embodiment, the compositions of the invention, *e.g.*, compositions suitable for lyophilization, comprise about 1-50 mg/mL, about 10-30 mg/mL or about 20-25 mg/mL of mannitol, and preferably comprise 20 mg/mL mannitol. In yet other embodiments, the compositions of the invention, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 40-60 mg, about 45-55 mg, or about 48-52 mg of mannitol. In one embodiment, the compositions
10 comprise about 50 mg, *e.g.*, about 49.5 mg, of mannitol.

In another embodiment, a suitable polyol for use in the compositions of the invention is glycerol. The compositions of the invention may comprise about 1-50 mg/mL, about 10-40 mg/mL, about 20-30 mg/mL, about 20-25 mg/mL, or about 20 mg/mL of glycerol.

15 One or more sugars may also be added to the compositions of the invention. Non-limiting examples of sugars that are useful in the compositions of the invention include maltose, lactose, cellobiose, gentiobiose, melibiose, and turanose, fructose, levulose, glucose, and dextrose, lactose, sucrose, and trehalose (also known as mycose or tremalose), raffinose, melezitose, stachyose, and verbascose. In certain embodiments,
20 the concentration of sugar is about 1 to about 120 mg/ml, about 1 to about 100 mg/mL, about 10 to about 90 mg/mL, about 20 to about 80 mg/mL, about 30 to about 70 mg/mL, about 40 to about 60 mg/mL, or about 50 to about 60 mg/mL. In other embodiments, the compositions of the invention, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 10-120, about 20-120, about 30-120, about 40-120, about 50-120, about 60-120, about 10-
25 110, about 10-100, about 10-90, about 10-80, about 10-70 mg of a sugar.

In certain embodiments, the sugar is sucrose and is present in the compositions of the invention at about 10-100 mg/mL, about 10-90 mg/mL, about 10-80 mg/mL, about 10-70 mg/mL, about 20-90 mg/mL, about 20-80 mg/mL, about 20-70 mg/mL, about 30-70 mg/mL, or about 25-65 mg/mL of sucrose. In one embodiment, the
30 compositions comprise about 70 mg/mL of sucrose. In one embodiment, the compositions, *e.g.*, compositions suitable for lyophilization, comprise about 5 mg/mL of sucrose. In one embodiment, the compositions, *e.g.*, compositions suitable for lyophilization, comprise about 45 mg/mL of sucrose. In another embodiment, the compositions, *e.g.*, compositions suitable for lyophilization, comprise about 46 mg/mL
35 of sucrose.

In yet other embodiments, the compositions of the invention, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 1-100, about 1-70, about 1-50, about 10-120 mg, about 10-100 mg, about 10-50 mg, about 10-20 mg, or about 12 mg, *e.g.*, about 12.25 mg, of

sucrose. In one embodiment, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 50-120 mg, about 75 -120 mg or about 100-120 mg of sucrose, *e.g.*, about 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 or 120 mg of sucrose. In one embodiment, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 113 mg, of sucrose. In another embodiment, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 70 mg, of sucrose. In another embodiment, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 20 mg, of sucrose. In another embodiment, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 10 mg, of sucrose. In another embodiment, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 5 mg, of sucrose.

In another embodiment, the sugar is trehalose. Trehalose may be present in the compositions at about 10-100 mg/mL, about 10-90 mg/mL, about 10-80 mg/mL, about 10-70 mg/mL, about 20-90 mg/mL, about 20-80 mg/mL, about 20-70 mg/mL, about 30-70 mg/mL, about 25-65 mg/mL, or about 35-55 mg/ml. In one embodiment, the compositions, *e.g.*, compositions suitable for lyophilization, comprise about 40-50 mg/ml, *e.g.*, about 45 mg/mL of trehalose.

Concentrations and ranges of sugars intermediate to the above recited concentrations are also intended to be part of this invention (*e.g.*, about 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 or about 120 mg/mL of sugars). Ranges of concentrations of sugars using a combination of any of the above-recited values as upper and/or lower limits are intended to be included, *e.g.*, 35-70 mg/ml of sugars.

In other embodiments, any combination of one or more of the foregoing sugars and one or more of the foregoing polyols may be included together in a composition of the invention. For example, a composition of the invention, *e.g.*, a composition suitable for lyophilization, may comprise a polyol, *e.g.*, mannitol, and a sugar, *e.g.*, sucrose. In certain embodiments, the molar ratio of the anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof, to polyol (*e.g.*, mannitol), sugar (*e.g.*, sucrose) or combinations thereof (*e.g.*, mannitol and sucrose) is greater than about 1:1200, preferably greater than about 1:1400, more preferably between about 1:1400 and 1:1500, or greater than about 1:1500.

In certain embodiments of the invention, the compositions further comprise an amino acid, *e.g.*, methionine. In one embodiment, the compositions comprise about 1-10 mM, about 2-10 mM, about 2-9 mM, about 2-8 mM, about 2-7 mM, about 2-6 mM, about 2-5 mM, about 3-8 mM, about 3-7 mM, about 3-6 mM, or about 3-5 mM of

methionine. In one embodiment, the compositions comprise about 4 mM methionine. In another embodiment, the compositions comprise about 5 mM methionine. In one embodiment, the compositions comprising methionine also comprise a polyol, *e.g.*, mannitol and/or a sugar, *e.g.*, sucrose. In one embodiment, the compositions comprise methionine, mannitol and sucrose. In one embodiment, the compositions do not comprise an amino acid, *e.g.*, methionine.

In certain embodiments of the invention, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, may comprise between about 0.1-10 mg, 0.5-9 mg, 1.0-8 mg, 1-6 mg, 1-5 mg, 1-4 mg, 1-3 mg or 1-2 mg, *e.g.*, about 1.5, 1.6, 1.7, 1.75, 1.8, 1.81, 1.82, 1.83, 1.84, 1.85, 1.9, or 2.0 mg of methionine. In one embodiment, the compositions, *e.g.*, lyophilized compositions, comprise about 1.8 mg, *e.g.*, 1.83 mg, of methionine. Ranges and amounts intermediate to the above-recited concentrations and amounts of methionine are also intended to be part of this invention, *e.g.*, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, and 10 mM. In addition, ranges of values using a combination of any of the above-recited values as upper and/or lower limits are intended to be included, *e.g.*, 3.5- 9 mM.

In one embodiment, the composition is essentially free of preservatives, such as benzyl alcohol, phenol, m-cresol, chlorobutanol and benzethonium Cl. In another embodiment, a preservative may be included in the composition. One or more other pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers such as those described in Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) may be included in the composition provided that they do not significantly adversely affect the desired characteristics of the composition. Acceptable carriers, excipients or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed and include; additional buffering agents; co-solvents; antioxidants including ascorbic acid and methionine; chelating agents such as EDTA; metal complexes (*e.g.*, Zn-protein complexes); biodegradable polymers such as polyesters; and/or salt-forming counterions such as sodium.

In particular embodiments, the pharmaceutical compositions of the invention are formulated as a liquid either comprising, consisting essentially of, or consisting of (a) about 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 or 20-75 mg/mL of an anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof; (b) about 5-50, 5-30, 5-20 or 10-20 mM histidine; and (c) about 0.01-0.02% polysorbate 80; wherein the pH of the composition is about 5.0-6.0 or about 5.5. In certain preferred embodiments, the anti-NGF antibody is PG100 or an antigen binding fragment of PG110. In certain preferred embodiments, the concentration of histidine is about 10 or 15 mM.

In particular embodiments, the pharmaceutical compositions of the invention are formulated as a liquid either comprising, consisting essentially of, or consisting of (a)

about 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 or 20-75 mg/mL of an anti-NGF antibody , or antigen binding fragment thereof; (b) about 5-50, 5-30, 5-20 or 10-20 mM histidine; (c) about 0.01-0.2% polysorbate 80; and (d) about 20-80, 30-80 or 40-80 mg of a polyol; wherein the pH of the composition is about 5.0-6.0 or about 5.5. In certain preferred
5 embodiments, the anti-NGF antibody is PG100 or an antigen binding fragment of PG110. In certain preferred embodiments, the concentration of histidine is about 10 or 15 mM. In certain preferred embodiments, the polyol is mannitol or sorbitol. In other preferred embodiments, the concentration of polyol is 20, 30 or 40 mg/mL. In other preferred embodiments, the composition further comprises a sugar, preferably sucrose or
10 trehalose, at about 10-20, 20-50 or 30-80 mg/mL.

In particular embodiments, the pharmaceutical compositions of the invention are formulated as a liquid either comprising, consisting essentially of, or consisting of (a) about 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 or 20-75 mg/mL of an anti-NGF antibody , or antigen binding fragment thereof; (b) about 5-50, 5-30, 5-20 or 10-20 mM histidine; (c)
15 about 0.01-0.2% polysorbate 80; and (d) about 20-80, 30-80 or 40-80 mg/mL of a sugar; wherein the pH of the composition is about 5.0-6.0 or about 5.5. In certain preferred embodiments, the anti-NGF antibody is PG100 or an antigen binding fragment of PG110. In certain preferred embodiments, the concentration of histidine is about 10 or 15 mM. In certain preferred embodiments, the sugar is sucrose or trehalose. In other
20 preferred embodiments, the concentration of sugar is 70 or 80 mg/mL. In particular embodiments, the pharmaceutical compositions of the invention are provided in lyophilized form suitable for reconstitution to liquid form. For each mL of reconstituted liquid, the lyophilized compositions comprise, consist essentially of, or consist of (a) about 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 or 20-75 mg of an anti-NGF
25 antibody , or antigen binding fragment thereof; (b) about 1-20, 1-10, 1-5 or 2-4 mg histidine; and (c) about 0.1 to 0.2 mg polysorbate 80. In certain preferred embodiments, the compositions contain about 10, 20 or 50 mg of PG100 or an antigen binding fragment of PG110. In certain preferred embodiments, the composition contains about 2-3 mg histidine. In certain preferred embodiments the composition contains 0.1 mg
30 polysorbate 80.

In particular embodiments, the pharmaceutical compositions of the invention are provided in lyophilized form suitable for reconstitution to liquid form. For each mL of reconstituted liquid, the lyophilized compositions comprise, consist essentially of, or consist of (a) about 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 or 20-75 mg of an anti-NGF
35 antibody , or antigen binding fragment thereof; (b) about 1-20, 1-10, 1-5 or 2-4 mg histidine; (c) about 0.1 to 0.2 mg polysorbate 80; and (d) about 20-80, 30-80 or 40-80 mg of a polyol. In certain preferred embodiments, the compositions contain about 10, 20 or 50 mg of PG100 or an antigen binding fragment of PG110. In certain preferred

embodiments, the composition contains about 2-3 mg histidine. In certain preferred embodiments the composition contains 0.1 mg polysorbate 80. In certain preferred embodiments, the composition contains 10, 20, 30 or 40 mg mannitol or sorbitol. In certain preferred embodiments, the composition further contains about 10-40 mg of a sugar, preferably sucrose or trehalose.

In particular embodiments, the pharmaceutical compositions of the invention are provided in lyophilized form suitable for reconstitution to liquid form. For each mL of reconstituted liquid, the lyophilized compositions comprise, consist essentially of, or consist of (a) about 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 or 20-75 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof; (b) about 1-20, 1-10, 1-5 or 2-4 mg histidine; (c) about 0.1 to 0.2 mg polysorbate 80; and (d) 20-80, 30-80 or 40-80 mg/mL of a sugar. In certain preferred embodiments, the compositions contain about 10, 20 or 50 mg of PG100 or an antigen binding fragment of PG110. In certain preferred embodiments, the composition contains about 2-3 mg histidine. In certain preferred embodiments the composition contains 0.1 mg polysorbate 80. In certain preferred embodiments, the composition contains about 20, 40, 70 or 80 mg of a sugar, preferably sucrose or trehalose.

The compositions of the invention may also be combined with one or more other therapeutic agents as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect the antibody of the composition. Such therapeutic agents are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The compositions to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes prior to, or following, preparation of the composition.

As described above, the compositions of the invention, *e.g.*, liquid, suitable for lyophilization and lyophilized compositions, have advantageous stability and storage properties. Stability of the liquid composition is not dependent on the form of storage, and includes, but is not limited to, compositions which are frozen, lyophilized, spray-dried, or compositions in which the active ingredient is suspended. Stability can be measured at a selected temperature for a selected time period. In one aspect of the invention, the protein in the liquid compositions is stable in a liquid form for at least about 3 months; at least about 4 months, at least about 5 months; at least about 6 months; at least about 12 months; at least about 18 months or longer. Ranges intermediate to the above recited time periods are also intended to be part of this invention, *e.g.*, about 9 months, and so forth. In addition, ranges of values using a combination of any of the above-recited values as upper and/or lower limits are intended to be included.

Preferably, the composition is stable at room temperature, or at about 30°C, or at 40°C for at least about 1 month and/or stable at about 2-8°C for at least about 1 year, or more preferably stable at about 2-8°C for at least about 2 years. Furthermore, the composition is preferably stable following freezing (to, *e.g.*, -80°C) and thawing of the composition, hereinafter referred to as a "freeze/thaw cycle." In one embodiment, the composition is stable following one, two, three or more freeze-thaw cycles.

Stability of a protein in a liquid composition may also be defined as the percentage of monomer, aggregate, or fragment, or combinations thereof, of the protein in the composition, for example, as measured by UV light scattering or by size exclusion chromatography. In one aspect of the invention, a stable liquid composition is a composition having less than about 10%, and preferably less than about 5% and more preferably less than about 2% of the protein being present as aggregate in the composition.

In one embodiment, the physical stability of a liquid composition is determined by determining turbidity of the composition following a stir stress assay, *e.g.*, 24 hour or 48-hour stir-stress assay. For example, a stir stress assay may be performed by placing a suitable volume of a liquid composition in a beaker with a magnetic stirrer, *e.g.*, (multipoint HP, 550 rpm), removing aliquots at any suitable time, *e.g.*, at T0-T48 (hrs), and performing suitable assays as desired on the aliquots. Samples of a composition under the same conditions but without stirring serve as control. Turbidity measurements may be performed using a laboratory turbidity measurement system from Hach (Germany) and are reported as nephelometric units (NTU).

The compositions of the invention also have advantageous tolerability properties. Tolerability is evaluated based on assessment of subject-perceived injection site pain using the Pain Visual Analog Scale (VAS). A (VAS) is a measurement instrument that measures pain as it ranges across a continuum of values, *e.g.*, from none to an extreme amount of pain. Operationally a VAS is a horizontal line, about 100 mm in length, anchored by numerical and/or word descriptors, *e.g.*, 0 or 10, or 'no pain' or 'excruciating pain', optionally with additional word or numeric descriptors between the extremes, *e.g.*, , mild, moderate, and severe; or 1 through 9) (see, *e.g.*, Lee et al. (2000) Acad. Emerg. Med. 7:550).

Additional indicators of tolerability that may be measured include, for example, the Draize Scale (hemorrhage, petechiae, erythema, edema, pruritus) and bruising.

III. Anti-NGF Antibodies

Anti-NGF antibodies that may be used in the pharmaceutical compositions of the invention are described, for example, in PCT Publication No. WO/2010/128398, 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

- 5 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, the entire contents of each of which are hereby incorporated herein by reference, particularly, the contents as relating to anti-NGF antibodies.

- 10 In one embodiment, the anti-NGF antibodies to be used in the pharmaceutical compositions 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
- 15 increase in the distribution volume of the antibody. Preferably, the antibodies to be used in the pharmaceutical compositions 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
- 20 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.

- In one embodiment, an anti-NGF antibody to be used in the pharmaceutical
- 25 compositions 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-
- 30 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).

- In one embodiment, a preferred anti-NGF antibody for use in pharmaceutical compositions of the invention, PG110, exhibits a mean terminal elimination half life in cynomolgus monkeys of at least 15 days and typically longer. For example, in one
- 35 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).

In one embodiment, the pharmaceutical compositions of the invention comprise anti-NGF antibodies wherein the preferred hinge region mutation 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).

In one embodiment, the pharmaceutical compositions of the invention contain an anti-NGF antibody, or antigen-binding portion thereof, comprising 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 anti-NGF antibody for use in the pharmaceutical compositions of the invention comprises 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 anti-NGF antibody for use in the pharmaceutical compositions of the invention comprises a heavy chain comprising the amino acid
5 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 anti-NGF antibody for use in the pharmaceutical compositions of the invention comprises a heavy chain encoded by the nucleotide
10 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, the anti-NGF antibody for use in the pharmaceutical compositions of the invention comprises the
15 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
20 anti-NGF antibody for use in the pharmaceutical compositions 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 for use in the pharmaceutical compositions of the invention comprises a heavy chain variable region comprising CDRs 1, 2 and 3 having the amino
25 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 for use in the pharmaceutical compositions of the invention can comprise heavy and light chain variable regions
30 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
35 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
5 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
10 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
15 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.

20 In yet another embodiment, , an anti-NGF antibody for use in the pharmaceutical compositions 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.
25 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,
30 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.
35 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),
5 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
10 tested for retained function using the functional assays described herein.

In yet another embodiment, , an anti-NGF antibody for use in the pharmaceutical compositions 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
15 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
20 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
25 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, have been described previously (*e.g.*, WO/2010/128398).

In still other embodiments, an anti-NGF antibody useful in the compositions of
30 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:

- 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);
- 35 • binds to human or rat NGF with a K_D of 100 pM or less;
- inhibits binding of NGF to TrkA or p75^{NTR};
- inhibits NGF-dependent proliferation of TF-1 cells;
- inhibits NGF-dependent chick dorsal root ganglion survival;

- inhibits NGF-dependent PC12 cell neurite outgrowth.

These functional properties can be assessed using the *in vitro* assays known in the art and described in, for example, WO/2010/128398. 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 anti-nerve growth factor (NGF) antibody for use in the pharmaceutical compositions of the invention comprises 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 pM 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 for use in the pharmaceutical compositions 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 described herein allows them to avoid

exhibiting a rebound effect. Thus, other advantages of the anti-NGF antibodies used in the compositions 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 such anti-NGF antibodies, lower dosages can be used (as compared to other anti-NGF antibodies), and compositions containing 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 for use in the pharmaceutical compositions 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 for use in the pharmaceutical compositions 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 for use in the compositions 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 for use in the pharmaceutical compositions 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 association 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-naphthalenesulfonyl 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.

IV. Antibody Production

Anti-NGF antibodies for use in the pharmaceutical compositions of the invention may be produced using nucleic acid molecules that encode the anti-NGF antibodies. 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.

In one embodiment, an anti-NGF antibody for use in the pharmaceutical compositions of the invention is encoded by a nucleic acid molecule comprising the
5 nucleotide sequence of SEQ ID NO: 11. In another embodiment, an anti-NGF antibody for use in the pharmaceutical compositions of the invention is encoded by a nucleic acid molecule comprising 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
10 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.

15 Antibodies for use in the pharmaceutical compositions of the invention 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,
20 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
25 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
30 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).

35 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
5 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,
10 (*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 SR α promoter system, which contains sequences from the SV40 early promoter and the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type 1
15 (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
20 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
25 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
30 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
35 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 one embodiment, an anti-NGF antibody for use in the pharmaceutical compositions of the invention is produced using an expression vector, 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 comprises the GS (glutamine synthetase) gene. In another preferred embodiment, the preferred host cell of the invention is a CHO (Chinese Hamster Ovary) cell.

In yet another preferred embodiment, the anti-NGF antibody for use in the pharmaceutical compositions of the invention is produced by culturing a host cell comprising an expression vector which 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.

V. Methods of Administration

A pharmaceutical 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. Generally, a pharmaceutical composition of the invention 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). In certain preferred embodiments, the pharmaceutical composition of the

invention are suitable for administration intravenously, subcutaneously (*e.g.*, via an injection pen) or intra-articularly.

Pharmaceutical compositions of the invention can be administered alone or in combination therapy, *i.e.*, combined with other agents. For example, the combination
5 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, a pharmaceutical composition of the invention comprising an anti-NGF antibody or antigen binding fragment thereof, is
10 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
15 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),
20 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
25 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,
30 oxycodone, oxymorphone, desomorphine, diacetylmorphine, nicomorphine, dipropanoylmorphine, benzylmorphine, ethylmorphine, fentanyl, pethidine, methadone, tramadol and propoxyphene. Examples of atypical analgesics include tricyclic anti-depressants, carbamazepine, gabapentin, pregabalin, duloxetine and caffeine. Examples of steroids include intraarticular corticosteroids (IACs) and prednisone. Examples of
35 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 pharmaceutical composition 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
5 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
10 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
15 inhibitors include ARRY-470 and ARRY-872 (Array Biopharma).

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

Sterile injectable formulations of the pharmaceutical compositions of the invention can be prepared by incorporating the active compound with one or a combination of ingredients (*e.g.*, buffer, excipient, etc.) enumerated above, as required, followed by sterilization microfiltration. Generally, dispersions are prepared by
25 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-
30 filtered solution thereof.

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
35 produce the desired therapeutic effect.

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.

In one embodiment, an effective amount of the composition of the present invention is an amount that inhibits NGF activity in a subject suffering from a disorder in which NGF activity is detrimental. In one embodiment, the composition provides an effective dose of 100 mg per injection of the antibody. In another embodiment, the composition provides an effective dose which ranges from about 0.1 to about 100 mg of antibody. If desired, the effective daily dose of the pharmaceutical composition may be administered as two, three, four, five, six or more sub-doses administered separately at appropriate intervals throughout the day, optionally, in unit dosage forms

In one embodiment of the invention, the dosage of the antibody in the composition is between about 5 and about 150 mg. In another embodiment, the dosage of the antibody in the composition is between about 25 and about 100 mg. In another embodiment, the dosage of the antibody in the composition is between about 40 and about 80 mg. In another embodiment, the dosage of the antibody in the composition is between about 50 and about 100 mg. In another embodiment, the dosage of the antibody in the composition is between about 0.1 and about 100 mg, between about 0.5 and 75 mg, between about 1.0 and 60 mg, between about 5 and 40 mg, between about 10 and 30 mg, or between about 10 and 20 mg. The composition is especially suitable for large antibody dosages of more than 10 mg. In a particular embodiment of the invention, the composition provides an antibody at a dose of about 10 mg or about 20 mg. In another embodiment, the composition provides an antibody at a dose of about 80 mg or about 100 mg.

In one embodiment of the invention, the dosage of the antibody in the composition is between about 0.1 to about 150 mg, 1 to about 150 mg, about 5 to about 145 mg, about 10 to about 140 mg, about 15 to about 135 mg, about 20 to about 130 mg, about 25 to about 125 mg, about 30 to about 120 mg, about 35 to about 115 mg, about 40 to about 110 mg, about 45 to about 105 mg, about 50 to about 100 mg, about 55 to about 95 mg, about 60 to about 90 mg, about 65 to about 85 mg, about 70 to about 80 mg, or about 75 mg. In one embodiment, the dosage of the antibody is 10 mg. In one embodiment, the dosage of the antibody is 20 mg. Ranges intermediate to the above recited dosages, *e.g.*, about 2 to about 149 mg are also intended to be part of this invention. For example, ranges of values using a combination of any of the above recited values as upper and/or lower limits are intended to be included.

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 that described in PCT publication WO 2008/005315.). 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), pulmonary administration can be employed, *e.g.*, by use of an inhaler or nebulizer, and composition with an aerosolizing agent. See, *e.g.*, U.S. Patent Nos. 6,019,968; 5,985,320; 5,985,309; 5,934,272; 5,874,064; 5,855,913; 5,290,540; and 4,880,078; and PCT Publication Nos. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, and WO 99/66903

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 pharmaceutical compositions of the invention can be further 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. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

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.

In a preferred embodiment, the anti-NGF antibody is the PG110 antibody or antigen binding fragment thereof, and 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 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, PG110 or fragment thereof 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).

V. Methods of Use

5 The invention provides stable, high concentration compositions with an extended shelf life, which, in one embodiment, are used to inhibit NGF activity in a subject suffering from a disorder in which NGF activity is detrimental. The methods generally comprise administering to the subject a composition of the invention such that NGF activity in the subject is reduced or inhibited. Preferably, the NGF is human NGF and
10 the subject is a human subject. Alternatively, the subject can be a mammal expressing NGF with which an antibody of the invention cross-reacts. Still further the subject can be a mammal into which has been introduced hNGF (*e.g.*, by administration of hNGF or by expression of a hNGF transgene). Moreover, a composition of the invention can be administered to a non-human mammal expressing an NGF with which the antibody
15 cross-reacts (*e.g.*, a primate, pig or mouse) for veterinary purposes or as an animal model of human disease. Regarding the latter, such animal models may be useful for evaluating the therapeutic efficacy of antibodies of the invention (*e.g.*, testing of dosages and time courses of administration).

 A composition of the invention can be administered to a human subject for
20 therapeutic or prophylactic purposes. Accordingly, 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 a pharmaceutical composition 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
25 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
30 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,
35 trigeminal neuralgia, pain from burns and/or wounds, pain associated with trauma, pain associated with musculoskeletal diseases, ankylosing spondylitis, 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 a pharmaceutical composition 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 a pharmaceutical composition 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 a pharmaceutical composition 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 diarrhoea. 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.

5 In a particularly preferred embodiment, a pharmaceutical composition 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
10 embodiment, the invention provides a method of treating pain in a subject comprising administering a pharmaceutical composition 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
15 administering a pharmaceutical composition 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 a pharmaceutical composition 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
20 neuropathic pain in a subject comprising administering a pharmaceutical composition 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 a pharmaceutical composition of the invention such that cancer pain in the subject is treated. In yet another embodiment, the invention provides
25 a method of treating endometriosis and/or uterine fibroid pain in a subject comprising administering a pharmaceutical composition of the invention such that endometriosis and/or uterine fibroid pain in the subject is treated.

 In a preferred embodiment, pharmaceutical composition of the invention comprises an anti-NGF antibody comprising a human IgG4 constant region comprising
30 the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10, and 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
35 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 pharmaceutical composition of the invention 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.*, extracellular 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 a pharmaceutical composition of the invention comprising 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).

- 5 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.

VI. Articles of Manufacture

- 10 Also within the scope of the present invention is an autoinjector pen, a prefilled syringe, or a needle-free administration device comprising the liquid pharmaceutical composition of the invention. In one embodiment, the invention features a delivery device comprising a dose of the composition comprising 100 mg/mL of an anti-human NGF antibody, or antigen-binding portion thereof, *e.g.*, an autoinjector pen or prefilled
- 15 syringe comprises a dose of about 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg, 20 mg, 21 mg, 22 mg, 23 mg, 24 mg, 25 mg, 26 mg, 27 mg, 28 mg, 29 mg, 30 mg, 31 mg, 32 mg, 33 mg, 34 mg, 35 mg, 36 mg, 37 mg, 38 mg, 39 mg, 40 mg, 41 mg, 42 mg, 43 mg, 44 mg, 45 mg, 46 mg, 47 mg, 48 mg, 49 mg, 50 mg, 51 mg, 52 mg, 53 mg, 54 mg, 55
- 20 mg, 56 mg, 57 mg, 58 mg, 59 mg, 60 mg, 61 mg, 62 mg, 63 mg, 64 mg, 65 mg, 66 mg, 67 mg, 68 mg, 69 mg, 70 mg, 71 mg, 72 mg, 73 mg, 74 mg, 75 mg, 76 mg, 77 mg, 78 mg, 79 mg, 80 mg, 81 mg, 82 mg, 83 mg, 84 mg, 85 mg, 86 mg, 87 mg, 88 mg, 89 mg, 90 mg, 91 mg, 92 mg, 93 mg, 94 mg, 95 mg, 96 mg, 97 mg, 98 mg, 99 mg, 100 mg, 101 mg, 102 mg, 103 mg, 104 mg, or 105 mg of the composition.

- 25 Also within the scope of the present invention are kits comprising the pharmaceutical compositions of the invention in liquid or lyophilized form, and 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
- 30 with the kit, or which otherwise accompanies the kit.

- For example, the invention also provides a packaged pharmaceutical composition of the invention 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
- 35 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 anti-NGF antibody (*e.g.*, PG110), for the treatment of an NGF related disease or

5 condition described herein.

A kit or an article of manufacture refers to a packaged product comprising components with which to administer a pharmaceutical compositions of the invention 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
10 administering the pharmaceutical composition 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 pharmaceutical composition of the invention, include, for example, bottles, vials, syringes, pens, etc.

15 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
20 administering the pharmaceutical composition of the invention for treatment, that the pharmaceutical composition of the invention 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 pharmaceutical composition of the invention, including alleviation of pain. In another embodiment, the package insert can
25 include a description of the dosage of the anti-NGF in the pharmaceutical composition of the invention. In another embodiment, the package insert can include a description of the route and frequency of administration of the pharmaceutical composition of the invention. In another embodiment, the package insert of the invention may also provide information to subjects who will be receiving the pharmaceutical composition of the
30 invention 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
35 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

- 5 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

- 10 The Examples presented below detail experiments performed to examine the effects of solution pH, freeze-thawing, PG110 protein concentration, and various buffers and excipients on the physical and chemical stability of PG110 in order to develop a suitable formulation of PG110.

- The following analytical methods were used in experiments performed to assess
15 and monitor the stability of PG110 in solution.

General Methods

- PG110 formulations were tested for general quality parameters (*e.g.*, pH), parameters of physical stability (*e.g.*, clarity, color, particle contamination and purity), and parameters of chemical stability, deamidation, oxidation, general chemical stability,
20 and size exclusion chromatography (SEC). Exemplary tests included tests for visible particulate contamination, light obscuration particle count tests for subvisible particles, and tests for purity such as size exclusion HPLC and image capillary isoelectric focusing.

- Particulate contamination (*e.g.*, visible particles) was determined by visual inspection. Subvisible particles were monitored by the light blockage method according
25 to United States Pharmacopeia (USP). In addition, the physicochemical stability of formulations was assessed by SEC, which allows for the detection of fragments and aggregates.

- To monitor chemical stability, size exclusion high pressure liquid chromatography (SE-HPLC) (for the detection of fragments and hydrolysis in a
30 specimen of a formulation) and icIEF (image capillary isoelectric focusing) were performed.

icIEF Methods

- icIEF analyses were performed using the iCE280 imaging cIEF system with a PrinCE autosampler (Covergent Biosciences). The Table 1 below lists the reagents and
35 materials used for the icIEF analyses.

Table 1

Reagent	Manufacturer	Product ID
1% Methyl cellulose solution	Convergent Bioscience	101876
0.5% Methyl cellulose solution	Convergent Bioscience	102505
Pharmalyte 3-10	GE healthcare	17-0456-01
0.08M H ₃ PO ₄ in 0.1% Methyl cellulose solution (anolyte)	Convergent Bioscience	102506
0.1M NaOH in 0.1% Methyl cellulose solution (catholyte)	Convergent Bioscience	102506
pI 5.12 marker	Convergent Bioscience	102224
pI 9.22 marker	Convergent Bioscience	102231

The iCE280 instrument was operated according to manufacturer instructions. Respective vials were filled with fresh anolyte and catholyte solutions, the waste vial was filled with MilliQ HPLC water, and the UV lamp was turned on.

pI markers were prepared by diluting both pI 5.12 and pI 9.22 markers 10-fold with MilliQ HPLC water, and mixing well.

PG110 samples for analysis were prepared by diluting PG110 test samples to 1 mg/mL with MilliQ HPLC water, combining the diluted antibody solution with the components in the table below, and vortexing briefly. Samples were subsequently transferred to glass inserts seated in autosampler tubes and degassed for 5 minutes before placement into a PrinCE autosampler.

Table 2

Component	Volume (μL)
1% Methyl cellulose	70
Pharmalyte 3-10	8
Diluted pI 5.12 marker	8
Diluted pI 9.22 marker	8
1 mg/mL sample	50
Water	56

Size Exclusion HPLC Methods

Size exclusion HPLC was used to determine the purity of PG110 solutions. The assay was performed as outlined below.

A TSK gel guard (cat. no. 08543, 6.0 mm x 4.0 cm, 7 μm), was combined with a TSK gel G3000SW (cat. no. 08541, 7.8 mm x 30 cm, 5 μm) and run with an upper column pressure limit of 70 bar. The mobile phase consisted of 100 mM Na₂HPO₄ / 200 mM Na₂SO₄, pH 7.0. This buffer was created by dissolving 49.68 g anhydrous disodium hydrogen phosphate and 99.44 g anhydrous sodium sulfate in approximately 3300 mL Milli-Q water, adjusting the pH to 7.0 using 1 M phosphoric acid, increasing the buffer volume to 3500 mL with Milli-Q water and filtering the solution through a membrane filter.

Experimental parameters were as follows:

- 0.3 ml/min flow rate
- 20 μ L injection volume (equivalent to 20 μ g sample)
- room temperature column
- 5 • 2 to 8°C autosampler temperature
- 50 minute run time
- isocratic gradient

Detection was performed using a diode array detector using a 214 nm wavelength (> 0.1 min peak width and 8 nm band width) and a 360 nm reference wavelength (100 nm band width).

Test samples were injected in duplicate. Purity was determined by comparing the area of PG110 antibody peak to the total area of all 214 nm absorbing components in the sample, excluding buffer-related peaks. High molecular weight aggregates and antibody fragments were resolved from intact PG110 using this method.

15 Light Obscuration

Light obscuration assays were performed to measure the insoluble particulate content of antibody solutions. Light obscuration measurement equipment (particle counter, model syringe, Klotz (Bad Liebenzell, Germany, series S20037) was equipped with laminar air hood (Thermo Electron Corp., Asheville, NC, model no. ULT2586-9-A40) to minimize foreign particle contamination during measurements. Light obscuration analysis was performed as follows. A 3.5 mL sample was placed in a 5 mL round-bottom tube under laminar air flow conditions. Measurements were performed according to manufacturer's specifications in n=3 mode (0.8 mL per single measurement), after an initial 0.8 mL rinse.

25 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Prior to DSC analysis, proteins are dialyzed into a suitable buffer system using Slide-A-Lyzer Cassettes. This buffer system (10 mM phosphate, 10 mM citrate) is also used as a reference/blank for the DSC measurement. The antibody is analyzed at 1-2 mg/mL. An automated VP-DSC with Capillary Cell (Microcal) DSC instrument is used. Unfolding of the molecules is studied applying a 1°C/minute scan rate over a 25°C - 95°C temperature range. Other measurement parameters are: Fitting period: 16 sec, pre-scan wait: 10 min, feedback mode: none.

Visual Inspection

Visual Inspection of the protein samples were performed by carefully inspecting the protein solution in the sample container with the unaided eye. Typically, the samples are inspected against a white and a dark/black background to more readily identify visible particulate matter, haziness, opalescence, or protein precipitate and visible particles and agglomerates. Sample containers amenable for visual inspection can vary,

and may include containers such as translucent and clear Falcon tubes, glass vials, low-volume vials/tubes, and slide-a-lyzer cassettes.

Example 1: Impact Of Solution pH On The Stability Of PG110 Formulations During Repeated Freeze/Thaw Studies (-80°C/30°C).

The freeze thaw behavior of the ABT110 antibody at a protein concentration of 1 mg/mL in 10 mM citrate/10mM phosphate buffer was evaluated by cycling the protein solution up to 4 times between the frozen state and the liquid state at pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, and pH 8. Freezing was performed by means of a temperature controlled -80°C freezer, and thawing was performed by means of a 30°C temperature controlled water bath. Samples were pulled after each freeze/thaw (F/T) cycle and analyzed by SEC. About 20 mL of each PG110 solution was placed in 30 mL PETG repositories for this experiment. Table 3 provides an overview on testing intervals for SEC and the number of freeze/thaw cycles performed. Table 4 shows the effect of freeze/thaw processing on the amount of monomer of PG110 remaining and the amount of fragments and aggregates formed in the samples formulated at these pH levels.

Table 3: Testing Intervals: Number Of Freeze (-80°C) And Thaw (30°C Water Bath) Cycles Tested

	Testing Intervals: Number of Freeze/Thaw Cycles and Sample Requirements for Testing	
Storage Temperature For Stress Test	T ₀	4
-80°C/30°C Cycling Study	1	1

Table 4: Physical Stability Of PG110 During Repeated Freeze/Thaw Cycling As Determined Via SEC

Monomer					
f/t cycles	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
T0	98.53	98.46	98.39	98.11	98.00
T4	96.74	96.46	97.81	97.91	97.55
Aggregates					
f/t cycles	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
T0	1.31	1.41	1.47	1.74	1.85
T4	3.00	3.34	2.00	1.94	2.24
Fragments					
f/t cycles	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
T0	0.15	0.11	0.13	0.14	0.14
T4	0.24	0.18	0.18	0.13	0.19

The results show that the amount of PG110 monomer slightly decreased during repeated freeze/thaw (F/T) processing, however, only to a small extent and more than 95% of intact monomer remained stable in solution.

Light obscuration experiments were conducted to determine the number of subvisible particles formed during each freeze/thaw step. Table 5 provides an overview on testing intervals for light obscuration and the number of freeze/thaw cycles performed. Tables 6 and 7 show the effect of freeze/thaw processing on the number of particles of size greater than equal to 1 micrometer/mL and greater than equal to 10 micrometer, respectively.

Table 5: Testing Intervals: Number Of Freeze (-80°C) And Thaw (30°C Water Bath) Cycles Tested

	Testing Intervals: Number of Freeze/Thaw Cycles and Sample Requirements for Testing	
Storage Temperature For Stress Test	T ₀	3
-80°C/30°C Cycling Study	2	2

Table 6: Physical Stability Of PG110 During Repeated Freeze/Thaw Cycling As Determined via sub visible particle measurements by light obscuration technique. Particles of size greater than equal to 1 micron/mL (data represent the average of two measurements)

	0 F/T	Deviation from average	1 F/T	Deviation from average	2 F/T	Deviation from average	3 F/T	Deviation from average
Water/control	15	3.75	30.41	7.5	19.37	4.79	29.37	9.79
pH 4	3605	140	8576	7716	10524	1432	45162	2117
pH 5	2150	1595	14793	1976	26302	8870	74402	9673
pH 6	207	4.58	53577	6670	30601	4386	75999	10809
pH 7	140	19	41932	4279	32737	50	54267	2828
pH 8	137	1.25	18862	2643	21725	1407	48981	623

Table 7: Physical Stability Of PG110 During Repeated Freeze/Thaw Cycling As Determined Via sub visible particle measurements by light obscuration technique. Particles of size greater than equal to 10 micron/mL (data represent the average of two measurements).

	0 F/T	Deviation from average	1 F/T	Deviation from average	2 F/T	Deviation from average e	3 F/T	Deviation from average
Water/control	0	0	2.08	2.08	1.25	0	0.79	0.79
pH 4	55.62	16	121	105	1375	147	3142	2789
pH 5	41	31	744	390	9293	5575	20507	14028
pH 6	5.62	0.62	993	253	3823	3.54	8039	1785
pH 7	4.58	0.41	494	49	3932	21	6517	1167
pH 8	4.79	1.45	301	244	4019	216	4063	735

Example 2: Impact Of Solution pH On Physico-Chemical Stability Of PG110 Formulations During Accelerated Storage

Important factors influencing protein stability during accelerated/long-term storage of protein liquid and lyophilized formulations are the pH of the formulations and the storage temperature. To assess the impact of these factors, the protein was exposed

to short-term storage at elevated temperatures during preformulation and formulation project stages in order to quickly gain insight in the formulation feasibility for long-term storage at lower temperatures (*e.g.*, 2-8°C).

Storage stability of the PG110 antibody in solution (2 mg/mL, 10 mM citrate/10mM phosphate buffer) was evaluated at various temperatures for prolonged periods of time at controlled temperature conditions. After defined storage periods, samples were pulled and the impact of storage time and storage temperature on PG110 stability was evaluated.

For this pH screening study, PG110 was formulated at pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, and pH 8 at 2 mg/mL in 10 mM phosphate, 10 mM citrate.

Samples were filled into sterile vials (approx. 500 µL each) and stored under controlled conditions (in temperature chambers and in the absence of light) at 40°C and 50°C. At predefined points of time, samples of prepared solutions were pulled for analysis according to the sample pull scheme provided in Table 8. Numbers refer to number of vials that were stored/pulled. The resulting data is provided in Tables 9 and table 10.

Table 8: Sample Pull Scheme

	T0	7 days	6m	12m
5°C			1	1
25°C			1	
40°C	1	1		
50°C		1		

Table 9: Monomer, Aggregate and Fragment Content Of PG110 Samples Formulated At Various pH After Long-Term Storage (SEC Data) when stored at 50°C

PG110 stored at 50°C						
Monomer						
Time	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
0	0	96.85	97	97.15	96.93	96.68
7 days	0	9.65	85.54	94.84	93.96	92.2
Aggregate						
0	100.00	1.75	1.75	1.62	1.95	2.12
7 days	100.00	86.22	12.41	3.06	4.00	5.19
Fragment						
0	0.00	1.39	1.23	1.21	1.10	1.18
7 days	0.00	4.12	2.03	2.08	2.03	2.60

Table 10: Monomer, Aggregate and Fragment Content Of PG110 Samples Formulated At Various pH After Long-Term Storage (SEC Data) when stored at various temperatures.

PG110 stored at Various temperatures						
Monomer						
Time	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
0	0	96.85	97	97.15	96.93	96.68
7 days, 40C	0	81.64	96.64	96.84	96.1	95.49
6 months, 25C	0	92.89	94.81	94.32	95.14	89.12
6 months, 5C	0	97.87	97.86	97.78	97.33	97.10
12 months, 5C	0	97.50	97.37	97.53	97.11	96.42
Aggregate						
0	100	1.75	1.75	1.62	1.95	2.12
7 days, 40C	100	15.32	1.78	1.65	2.56	3.08
6 months, 25C	100	2.55	2.38	3.02	2.71	2.81
6 months, 5C	100	1.38	1.56	1.64	1.95	2.22
12 months, 5C	100	1.40	1.62	1.57	2.04	2.67
Fragment						
0	0	1.39	1.23	1.21	1.1	1.18
7 days, 40C	0	3.03	1.57	1.49	1.33	1.42
6 months, 25C	0	4.55	2.79	2.64	2.14	8.05
6 months, 5C	0	0.73	0.57	0.56	0.71	0.66
12 months, 5C	0	1.08	1.00	0.88	0.83	0.90

- 5 Data for the image capillary iso-electric focusing for the above mentioned samples of accelerated stability was also evaluated. icIEF provides information on the chemical stability of the molecule. Tables 11 and 12 show the sample pull scheme and the data, respectively.

10

Table 11: Sample Pull Scheme

	T0	21 days	4 months	12 months
40°C	1	1	1	
25°C			1	
5°C			1	1

Table 12: Content Of the main, acidic and the basic species of PG110 Samples Formulated At Various pH After Long-Term Storage (iCIEF) when stored at various temperatures. The results also show the corresponding pI of the molecules.

T0				
Sample	Acidic	Main	Basic	pI
pH 4.0	33.27	55.38	11.35	7.01
pH 5.0	33.98	56.63	9.39	6.95
pH 6.0	32.57	57.13	10.3	7.01
pH 7.0	31.71	58.72	9.57	7.1
pH 8.0	31.98	59.03	8.99	7.12
40°C 21day				
	Acidic	Main	Basic	pI
pH 4.0	24.87	23.81	51.33	6.94
pH 5.0	46.38	44.1	9.53	6.94
pH 6.0	48.31	43.42	8.27	6.94
pH 7.0	56.99	37.06	5.95	6.94
pH 8.0	74.27	19.43	6.3	6.93
5°C 4 months				
	Acidic	Main	Basic	pI
pH 4.0	35.50	52.96	11.54	7.02
pH 5.0	33.43	56.73	9.84	7.01
pH 6.0	33.62	57.09	9.30	7.01
pH 7.0	34.56	56.49	8.95	7.01
pH 8.0	37.02	54.31	8.68	7.01
25°C 4 months				
	Acidic	Main	Basic	pI
pH 4.0	52.31	29.10	18.59	7.01
pH 5.0	44.39	45.58	10.03	7.02
pH 6.0	43.76	47.81	8.43	7.01
pH 7.0	53.44	40.08	6.48	7.01
pH 8.0	70.80	26.00	3.20	6.99
40°C 4 months				
	Acidic	Main	Basic	pI
pH 4.0	19.02	9.62	71.36	6.99
pH 5.0	74.96	7.37	17.68	7.01
pH 6.0	85.28	8.94	5.78	7.01
pH 7.0	95.74	4.26	0.00	6.98
pH 8.0	99.07	0.36	0.57	6.98
5°C 12 Months				
	Acidic	Main	Basic	pI
pH 4.0	37.21	52.58	10.21	7.17
pH 5.0	35.45	55.20	9.35	7.16
pH 6.0	34.95	55.48	9.57	7.14
pH 7.0	36.76	54.55	8.69	7.14
pH 8.0	42.54	49.29	8.17	7.12

These data demonstrate that a solution pH range of about pH 5-7 maintains PG110 stability best at increased temperatures. After 1 week of storage at 40°C and 50°C, monomer levels were highest in samples formulated at pH 6.

PG110 at 2 mg/mL outside of a pH 5-7 range clearly induced stability loss, mirrored by increased levels of aggregates and fragments. Fragment levels revealed a minimum of degradation in samples formulated at pH of about 6. The icIEF data also shows that a pH of about 6 was best to maintain stability of PG110. These data suggest that a pH of about 5.5 -6.5 maintains PG110 protein stability best at the specific stress conditions applied in this experiment.

Example 3: Impact Of formulations On The Stability Of PG110 Formulations During Repeated Freeze/Thaw Studies (-80°C/30°C) at 30 mg/mL conditions.

The freeze/thaw (F/T) behavior of the ABT110 antibody at a protein concentration of 30 mg/mL in different formulations was evaluated by cycling drug substance up to 3 times between the frozen state and the liquid state at pH 5.5. The formulations that were evaluated are:

- (1) 10 mM acetate + 125 mM sodium chloride pH 5.5
- (2) 15 mM Histidine pH 5.5
- (3) 15 mM histidine and 0.01 % Tween 80 pH 5.5

Freezing was performed by means of a temperature controlled -80°C freezer, and thawing was performed by means of a 30°C temperature controlled water bath. Samples were pulled after each freeze/thaw cycle and analyzed by SEC and visual inspection. About 1 mL of PG110 solution were placed in repositories for this experiment. Table 13 provides an overview on testing intervals for SEC and the number of freeze/thaw cycles performed. Table 14 shows the effect of freeze/thaw processing on the amount of monomer of PG110 remaining and the amount of fragments and aggregates formed in the samples formulated at these pH levels.

Table 13: Testing Intervals: Number Of Freeze (-80°C) And Thaw (30°C Water Bath) Cycles Tested

	Testing Intervals: Number of Freeze/Thaw Cycles and Sample Requirements for Testing	
Storage Temperature For Stress Test	T ₀	3
-80°C/30°C Cycling Study	1	1

Table 14: Physical Stability Of PG110 During Repeated Freeze/Thaw Cycling As Determined Via SEC

Acetate + NaCl pH 5.5				
Monomer	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	98.76	98.76	98.76	98.83
Aggregate	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	1.23	1.23	1.23	1.16
Fragment	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	0	0	0	0
15 mM Histidine, pH 5.5				
Monomer	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	98.82	98.82	98.83	98.85
Aggregate	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	1.17	1.17	1.16	1.14
Fragment	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	0	0	0	0
15 mM Histidine, 0.01 % Tween 80, pH 5.5				
Monomer	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	98.85	98.85	98.89	98.86
Aggregate	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	1.14	1.14	1.1	1.13
Fragment	T0	1 F/T	2F/T	3F/T
	0	0	0	0

The visual inspection of the various formulations showed that the histidine and tween 80 (polysorbate 80) containing formulations had minimal particle formation even after 3 F/T cycles, indicating that both histidine and Tween 80 are very suitable excipients for maintaining PG110 stability. The other two formulations showed much higher number of visible particles (20-30 visible particles per container).

10 **Example 4: Impact Of Formulation Parameters on the Stability Of PG110 Formulations During Microcalorimetry Studies (Intrinsic Stability) at 1 mg/mL Conditions.**

The thermodynamic stability (intrinsic stability) of the ABT110 antibody at a protein concentration of 1 mg/mL in different formulations was evaluated by using microcalorimetry. Heating was performed at a scan rate of 1° C/minute. The results are summarized in Table 15.

Table 15: The melting transition temperatures under different formulation conditions.

	Tm1	Tm2	Tm3
15 mM Histidine, pH 6	58.59	67.25	75.02
15 mM Phosphate, pH 6	68.3	74.68	77.22
15 mM Succinate, pH 6	68.4	74.62	77.09
10 mM Acetate + 125 mM NaCl, pH 5.5	65.5	72.99	76.21
Water, pH 6	69.82	75.58	77.81
10 Mm Citrate + 10 mM Phosphate + 0.01 % Tween 80, pH 6	67.8	73.96	76.69
10 Mm Citrate + 10 mM Phosphate + 40 mg/mL Mannitol, pH 6	68.5	74.52	77.2
10 Mm Citrate + 10 mM Phosphate + 40 mg/mL Sorbitol, pH 6	68.9	74.9	77.34
10 Mm Citrate + 10 mM Phosphate + 40 mg/mL Sucrose, pH 6	68.75	74.73	77.41
10 Mm Citrate + 10 mM Phosphate + 80 mg/mL Trehalose, pH 6	68.9	74.91	77.55
10 Mm Citrate + 10 mM Phosphate, pH 4	53.68	62.02	69.68
10 Mm Citrate + 10 mM Phosphate, pH 6	67.92	74.41	76.78
10 Mm Citrate + 10 mM Phosphate, pH 8	70.56	75.58	77.42

These data show that the intrinsic stability of PG110 is impacted by formulation parameters, *e.g.*, formulation pH and excipients.

Example 5: Impact Of Concentration On The Stability Of PG110 Formulation During Repeated Freeze/Thaw Studies (-80°C/30°C) at 100 mg/mL Conditions.

The freeze/thaw (F/T) behavior of the ABT110 antibody at a protein concentration of 100 mg/mL was evaluated by cycling the protein solution up to 4 times between the frozen state and the liquid state at pH 6. Previous data indicates that histidine is a suitable buffer/excipient for stabilization of PG110 and, thus, the stabilizing impact of histidine on PG110 protein stability was tested at 100 mg/mL protein concentration.

Freezing was performed by means of a temperature controlled -80°C freezer, and thawing was performed by means of a 30°C temperature controlled water bath. Samples were pulled after each freeze thaw cycle and analyzed by SEC and visual inspection. Table 16 provides an overview on testing intervals for SEC and the number of freeze/thaw cycles performed. Table 17 shows the effect of freeze/thaw processing on the amount of monomer of PG110 remaining and the amount of fragments and aggregates formed in the samples formulated at these pH levels.

Table 16: Testing Intervals: Number Of Freeze (-80°C) And Thaw (30°C Water Bath) Cycles Tested

	Testing Intervals: Number of Freeze/Thaw Cycles and Sample Requirements for Testing	
Storage Temperature For Stress Test	T ₀	1
-80°C/30°C Cycling Study	T2	2
-80°C/30°C Cycling Study	T4	2

5 **Table 17: Physical Stability Of PG110 formulated at high protein concentration (100 mg/mL) in pH 6, 15 mM histidine, during repeated freeze/thaw cycling As determined Via SEC.**

SEC data	Sample	T0	2 F/T	4F/T
Monomer	sample 1	98.0	97.9	97.9
	sample 2	-	97.9	97.9
Aggregate	sample 1	1.9	1.9	1.9
	sample 2	-	1.9	1.9
Fragment	sample 1	0.1	0.2	0.2
	sample 2	-	0.2	0.2

10 The data show that at 100 mg/mL, PG110 formulations did not undergo physical instability during repeated f/t processing, since monomer, aggregate and fragment levels virtually remained unchanged throughout the f/t experiment, indicating that histidine is a very suitable excipient for maintaining PG110 stability during f/t processing.

15 **Example 6: Impact of buffers and excipients on the turbidity and morphology of particles within PG110 formulations after dialysis as determined by visual inspection**

20 Earlier experience with PG110 has shown that the protein is prone to physical instability, as reflected by severe visible particle formation and precipitation phenomena when stored in a solution of 10 mM acetate, 125 mM NaCl at pH 5.5. This experiment was designed to verify if the visible particle formation is inherent to the protein itself or whether a formulation can be identified that maintains physical stability and reduces the particle formation susceptibility.

25 Since the aforementioned particles can be observed with the naked eye, a careful visual inspection of PG110 solutions formulated with different excipients is a very informative way to determine what formulation conditions can accelerate or prevent particle formation.

To carry this out, solutions of PG110 with the excipients listed in Table 18 and at a concentration of 1 mg/ml were prepared by dialysis.

Table 18: Buffers and excipients evaluated for their effect on PG110 visible particle formation in solution (universal buffer or UB6 is 10 mM phosphate, 10 mM citrate pH 6).

	•	15 mM sodium phosphate
5	•	15 mM sodium citrate
	•	15 mM sodium succinate
	•	15 mM arginine
	•	15 mM histidine
	•	Self-buffering formulation
10	•	10 mM universal buffer and 40 mg/mL mannitol
	•	10 mM universal buffer and 40 mg/mL sorbitol
	•	10 mM universal buffer and 80 mg/mL sucrose
	•	10 mM universal buffer and 80 mg/mL trehalose
	•	10 mM universal buffer and 0.01% (m/m) polysorbate 80
15	•	10 mM acetate, 125 mM NaCl

PG110 solution greater than 1 mg/ml was inserted into slide-a-lyzer cassettes with 10,000 MWCO and dialyzed against 1 L of the target buffer/excipient medium for 1 hour. Afterwards, the dialysis medium was replaced by fresh medium and the dialysis was continued overnight. Following dialysis, the concentration of the solutions was measured by UV280. If the concentration was too high, solutions were diluted with the corresponding buffer to the target concentration. If the concentration was too low, the solution was concentrated with Amicon Ultra centrifuge tubes to the target concentration. Next, the pH of the solutions was checked. If the pH was not within ± 0.1 of 6, the pH was adjusted to that target with 0.1 M NaOH or 0.1 M HCl. The condition of pH 6 was chosen based upon prior experiments which determined that it was near the optimal pH for chemical and physical stability. Afterwards, the solutions were passed through 0.20 μm filters into clear PETG containers. Distilled water was also passed through the same filters into PETG containers to serve as a control.

Following this procedure, PG110 solutions in the PETG vials were visually inspected for particles. The bottles were held against a soft fluorescent light as well as against a black background. The bottles were also gently shaken to cause the particles to flow, thus rendering visual inspection easier. The bottles were then stored at 4°C overnight. The next day, the bottles were removed from storage and inspected as above.

Inspection immediately after filtration revealed no visible particles in all samples. However, after storage overnight at 4°C, visual inspection revealed particle formation in many of the buffers/excipients. The findings are summarized in Table 19.

Table 19: Visual inspection findings of solutions of PG110 in the listed buffers/excipients. The solutions were inspected after filtration and storage overnight at 4°C. UB6 is 10 mM citrate, 10 mM phosphate pH 6.

Buffer/Excipient	Visual Observation
water	no particles
15 mM phosphate	dust-like fibers
15 mM citrate	dust-like fibers
15 mM succinate	lots of dust-like fibers
15 mM histidine	trace amounts of dust-like fibers
15 mM arginine	trace amounts of dust-like fibers
self buffering / just water	very small trace amounts of dust-like fibers
UB6 + 40 mg/ml sorbitol	dust-like fibers
UB6 + 40 mg/ml mannitol	trace amounts of dust-like fibers
UB6 + 80 mg/ml sucrose	dust-like fibers
UB6 + 80 mg/ml trehalose	dust-like fibers
UB6 +0.01% Tween80	Clear. No particles
10 mM acetate, 125 mM NaCl	lots of dust-like fibers

- 5 The data indicate that Tween-80 prevents the formation of visible particles, justifying its use. Of the given excipients that have buffering capacity at pH 6 (citrate, phosphate, succinate, histidine), the data indicate that histidine is best for preventing visible particle formation.

10 **Example 7: Impact of Buffers and Formulation Excipients on the Stability of PG110 Formulations during Repeated Freeze/Thaw Cycles (-80°C/30°C)**

- This example describes data of experiments conducted to evaluate the stabilization potential of various buffers and excipients in formulations of PG110 solutions at 2 mg/mL and pH of 6 upon repeated freeze (-80°C temperature controlled
15 freezer) and thaw (30°C temperature controlled circulating water bath) processing. (The condition of pH 6 was chosen based upon prior experiments which determined that it was near the optimal pH for chemical and physical stability). Buffers and excipients tested are listed in Table 20.

20 **Table 20: Buffers and excipients evaluated for their effect on PG110 DS degradation when exposed to freeze-thawing (universal buffer or UB6 is 10 mM phosphate, 10 mM citrate pH 6).**

- 15 mM sodium phosphate
 • 15 mM sodium citrate
25 • 15 mM sodium succinate
 • 15 mM arginine
 • 15 mM histidine
 • Low-ionic formulation (*i.e.* formulating in water)
 • 10 mM universal buffer and 40 mg/mL mannitol
30 • 10 mM universal buffer and 40 mg/mL sorbitol
 • 10 mM universal buffer and 80 mg/mL sucrose

- 10 mM universal buffer and 80 mg/mL trehalose
- 10 mM universal buffer and 0.01% (m/m) polysorbate 80
- 10 mM acetate, 125 mM NaCl

Samples were pulled at T0, T1 (after one freeze/thaw step), T2, and T3. One freeze-thaw processing step encompassed sample storage at -80°C for at least 4 hours and subsequent thawing of the sample in a 30°C circulating water bath. To analyze freeze-thaw samples, 5 mL round-bottom tubes were filled with 3.5 mL of antibody formulation (using a 5 mL pipette tip that has been rinsed with $0.2\text{ }\mu\text{m}$ filtered WFI) and subjected to light obscuration measurement. Furthermore, 0.1 mL of each sample was pulled for SEC analysis, and 0.2 mL of sample were pulled and stored at -80°C (reserve sample for optional additional analytical characterization).

Table 21: Sample Pull Scheme for Freeze-Thaw Experiments

	T0	T1	T2	T3	T4
$-80^{\circ}\text{C} / 30^{\circ}\text{C}$	Vial 1 Vial 2	Vial 1 Vial 2	Vial 1 Vial 2	Vial 1 Vial 2	Vial 1 Vial 2

* Vial denotes 30 mL PETG repository filled with sample solution

The effect of buffers and excipients on the formation of subvisible particles of size $\geq 1\text{ }\mu\text{m}$ and $\geq 10\text{ }\mu\text{m}$ during freeze thaw processing of PG110 is shown in Tables 22 and 23, respectively. SEC data is given in Tables 24, 25, and 26.

In some formulations, such as those with phosphate, citrate, sorbitol, mannitol, and sucrose, the number of particles $\geq 1\text{ }\mu\text{m/mL}$ increased after the first freeze-thaw cycle only to decrease after the second cycle. In other formulations, such as those containing histidine, arginine, or simply water, the number of particles $\geq 1\text{ }\mu\text{m/mL}$ increased after every freeze-thaw cycle. Particles $\geq 10\text{ }\mu\text{m/mL}$ increased after every freeze-thaw cycle for formulations with phosphate, citrate, succinate, histidine, arginine, and simply water. For formulations with sorbitol, mannitol, or sucrose particles $\geq 10\text{ }\mu\text{m/mL}$ increased after the first freeze-thaw cycle, but decreased with subsequent cycles. After one freeze-thaw cycle, formulations with sorbitol or mannitol had the greatest number of particles $\geq 1\text{ }\mu\text{m/mL}$ (at least $> \sim 200,000$) and also $\geq 10\text{ }\mu\text{m/mL}$ ($\sim 25,000$ average). However, after the third freeze-thaw cycle, all formulations revealed particles $\geq 1\text{ }\mu\text{m/mL}$ of less than 100,000 per mL.

Polysorbate 80 was found to have a positive effect with regard to maintaining PG110 stability, as it prevented the formation of subvisible particles during the freeze thaw processing of PG110. This is attributed to the polysorbate 80's ability to prevent the denaturation of the antibody at the ice-water interface. Sugars/sugar alcohols including mannitol, sorbitol, and sucrose were found induce subvisible particle formation after early freeze-thaw cycles. These observations are supported by the SEC

data which show a noticeable loss in % monomer and a corresponding increase in % aggregate for formulations with mannitol and sorbitol. (For all other excipients, SEC data does not differentiate in terms of stability.)

- 5 **Table 22: Number of particles $\geq 1 \mu\text{m/mL}$ measured after the listed freeze-thaw cycles. F/T0 is below freezing. UB6 is 10 mM phosphate, 10 mM citrate pH6. Water is pure water with no protein.**

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
	# $\geq 1 \mu\text{m}$		# $\geq 1 \mu\text{m}$		# $\geq 1 \mu\text{m}$		# $\geq 1 \mu\text{m}$	
Buffer	ave	sd	ave	sd	ave	sd	ave	sd
phosphate	536.67	94.58	17274.58	6372.51	9415.42	2353.78	9014.58	512.36
citrate	723.75	174.13	40620.83	795.79	27191.25	10421.87	10470.21	7553.08
succinate	1147.29	571.58	20720.21	2263.33	19527.29	8585.45	9504.17	1297.25
histidine	250.21	42.43	1647.08	617.25	8963.33	4741.45	21077.50	12656.92
arginine	690.63	557.44	2407.29	122.57	5858.54	2044.13	8314.17	6856.28
self/water	410.21	23.57	1622.50	811.11	8722.50	4459.19	21048.75	9602.80
UB6+sorbitol	1049.58	421.61	260052.29	31476.86	74827.29	21027.59	15613.54	10.02
UB6+mannitol	1113.33	260.75	209047.71	40784.74	78368.54	9137.59	26725.21	4711.10
UB6+sucrose	1330.00	169.41	43803.33	970.80	11592.08	408.65	7183.33	1182.34
UB6+trehalose	1320.63	306.41	9674.17	1445.15	15516.25	1373.26	9259.17	7457.91
UB6+tween 80	11.04	7.66	671.67	707.40	185.83	219.50	231.46	139.65
10 mM acetate/ 125 mM NaCl	954.58	231.28	17396.67	617.83	14698.13	1752.45	10400.00	4.42
water	18.96		14.79		39.38		49.38	

- 10 **Table 23. Number of particles $\geq 10 \mu\text{m/mL}$ measured after the listed freeze-thaw cycles. F/T0 is below freezing. UB6 is 10 mM phosphate, 10 mM citrate pH6. Water is pure water with no protein, low-ionic means the protein is formulated in water without additional excipients added.**

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
	# $\geq 10 \mu\text{m}$		# $\geq 10 \mu\text{m}$		# $\geq 10 \mu\text{m}$		# $\geq 10 \mu\text{m}$	
Buffer	ave	sd	ave	sd	ave	sd	ave	sd
phosphate	18.54	6.19	248.33	55.68	574.79	435.17	1224.38	408.94
citrate	26.67	12.37	533.96	383.61	968.75	192.10	899.17	217.14
succinate	138.33	128.46	359.38	149.67	908.75	207.42	1920.21	121.98
histidine	36.25	22.98	73.33	58.04	4456.88	3766.82	6125.21	3906.76
arginine	167.29	213.61	59.79	43.02	1113.33	500.28	2978.54	3415.92
Low-ionic	22.71	5.01	18.54	12.37	1871.88	2062.10	3028.33	2162.86
UB6+sorbitol	47.50	16.50	33930.83	12385.27	8329.79	2310.77	3302.50	1157.00
UB6+mannitol	41.25	4.12	16219.17	18940.15	7868.13	1498.18	1774.17	969.03
UB6+sucrose	43.33	1.77	3577.29	2615.12	2069.58	991.72	1427.92	1182.34
UB6+trehalose	27.71	4.42	173.75	82.79	1866.04	27.99	379.17	310.24
UB6+tween 80	5.42	3.54	370.63	497.92	11.04	5.01	17.50	18.56
10 mM acetate/ 125 mM NaCl	124.79	78.08	241.67	16.20	584.38	93.40	930.21	390.68
water	2.08		1.04		0.00		1.04	

Table 24: Percentage monomer of PG110 samples formulated in various buffers and excipients after storage during Freeze/Thaw experiments (SEC data) (UB6 is 10 mM citrate, 10 mM phosphate pH 6; "low ionic" is the protein in just water).

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
Buffer	ave	sd	ave	sd	ave	sd	ave	sd
phosphate	98.34	0.04	98.27	0.02	98.43	0.05	98.35	0.06
citrate	98.42	0.03	98.04	0.36	98.43	0.05	98.33	0.11
succinate	98.37	0.00	98.29	0.02	98.36	0.06	98.32	0.08
histidine	98.38	0.04	98.30	0.00	98.48	0.00	98.40	0.05
arginine	98.40	0.02	98.28	0.01	98.52	0.05	98.44	0.04
Low-ionic	98.47	0.02	98.37	0.01	98.47	0.02	98.35	0.02
UB6+sorbitol	98.40	0.04	97.87	0.05	98.04	0.04	98.05	0.03
UB6+mannitol	98.41	0.00	97.34	0.07	97.47	0.02	97.43	0.09
UB6+sucrose	98.40	0.02	98.35	0.01	98.60	0.01	98.57	0.01
UB6+trehalose	98.37	0.06	98.36	0.01	98.58	0.01	98.58	0.04
UB6+tween 80	98.23	0.04	98.26	0.04	98.55	0.02	98.57	0.02
10 mM acetate/ 125 mM NaCl	98.37	0.02	98.21	0.04	98.31	0.04	98.24	

5

Table 25: Percentage aggregate of PG110 samples formulated in various buffers and excipients after storage during Freeze/Thaw experiments SEC data) (UB6 is 10 mM citrate, 10 mM phosphate pH 6; low-ionic means the protein is formulated in water without additional excipients added.)

10

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
Buffer	ave	sd	ave	sd	ave	sd	ave	sd
phosphate	1.49	0.02	1.56	0.02	1.36	0.03	1.41	0.05
citrate	1.44	0.03	1.81	0.34	1.41	0.05	1.48	0.09
succinate	1.48	0.01	1.55	0.02	1.42	0.06	1.43	0.07
histidine	1.46	0.03	1.52	0.00	1.30	0.01	1.32	0.04
arginine	1.44	0.02	1.54	0.00	1.27	0.04	1.29	0.03
Low-ionic	1.37	0.00	1.45	0.01	1.29	0.02	1.36	0.01
UB6+sorbitol	1.47	0.04	1.98	0.04	1.77	0.04	1.74	0.03
UB6+mannitol	1.45	0.00	2.50	0.05	2.33	0.03	2.37	0.09
UB6+sucrose	1.46	0.01	1.48	0.01	1.23	0.01	1.23	0.02
UB6+trehalose	1.48	0.06	1.48	0.01	1.22	0.01	1.22	0.03
UB6+tween 80	1.61	0.04	1.56	0.04	1.24	0.00	1.21	0.01
10 mM acetate/ 125 mM NaCl	1.46	0.02	1.60	0.04	1.44	0.04	1.49	

Table 26: Percentage fragment of PG110 samples formulated in various buffers and excipients after storage during Freeze/Thaw experiments (SEC data) (UB6 is 10 mM citrate, 10 mM phosphate pH 6; low-ionic means the protein is formulated in water without additional excipients added)

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
Buffer	ave	sd	ave	sd	ave	sd	ave	sd
phosphate	0.17	0.02	0.18	0.00	0.20	0.03	0.24	0.01
citrate	0.14	0.00	0.15	0.02	0.17	0.00	0.20	0.01
succinate	0.15	0.00	0.16	0.00	0.22	0.00	0.25	0.01
histidine	0.15	0.02	0.18	0.00	0.21	0.00	0.28	0.01
arginine	0.15	0.00	0.18	0.00	0.20	0.01	0.27	0.01
Low-ionic	0.16	0.02	0.18	0.00	0.24	0.01	0.28	0.01
UB6+sorbitol	0.14	0.00	0.15	0.00	0.19	0.00	0.21	0.00
UB6+mannitol	0.13	0.01	0.16	0.01	0.20	0.01	0.20	0.00
UB6+sucrose	0.15	0.01	0.16	0.00	0.18	0.00	0.20	0.01
UB6+trehalose	0.14	0.00	0.16	0.01	0.19	0.00	0.20	0.01
UB6+tween 80	0.16	0.00	0.18	0.00	0.21	0.01	0.23	0.01
10 mM acetate/ 125 mM NaCl	0.17	0.00	0.19	0.00	0.25	0.00	0.27	

5

Example 8: Impact Of Buffers and Excipients on the Physico-Chemical Stability Of PG110 Formulations During Accelerated Stability Testing

Earlier examples have discussed the factors affecting the stability of PG110 formulations during long-term storage, including pH and storage temperature. In addition to these extrinsic factors, the formulation ingredients themselves must be evaluated for their impact on protein drug substance stability during storage. In order to carry this out, the protein drug substance is exposed to short-term storage at elevated temperatures during preformulation and formulation project stages in order to quickly gain insight in the formulation feasibility for long-term storage at lower temperatures (in most cases 2-8°C).

Storage stability of the PG110 antibody in solution was evaluated at various temperatures for prolonged periods of time at controlled temperature conditions at pH 6 in different buffers and excipients. The condition of pH 6 was chosen based upon prior experiments which determined that it was near the optimal pH for chemical and physical stability. After defined storage periods, samples were pulled and the impact of storage time and storage temperature on PG110 stability was evaluated by SEC and iCIEF.

In this study, PG110 was formulated at 2 mg/ml in various buffers and excipients listed in Table 27.

25

Table 27. Buffers and excipients tested for their affect on the physical and chemical stability of PG110 subjected to storage at elevated temperatures (universal buffer is 10 mM citrate, 10 mM phosphate pH 6)

5	• 15 mM sodium phosphate • 15 mM sodium citrate • 15 mM sodium succinate • 15 mM sodium acetate • 15 mM arginine • 15 mM histidine
10	• Low-ionic formulation • 10 mM universal buffer and 40 mg/mL mannitol • 10 mM universal buffer and 40 mg/mL sorbitol • 10 mM universal buffer and 80 mg/mL sucrose • 10 mM universal buffer and 80 mg/mL trehalose
15	• 10 mM universal buffer and 2.5% (m/m) glycerol • 10 mM universal buffer and 15 mM ammonium sulfate • 10 mM universal buffer and 20 mM sodium chloride • 10 mM universal buffer and 200 mM sodium chloride
20	• 10 mM universal buffer and 0.01% (m/m) polysorbate 80 • 10 mM universal buffer and 0.01% (m/m) polysorbate 20 • 10 mM universal buffer and 0.1% (m/m) poloxamer 188

Samples were then stored under controlled conditions (in temperature chambers and in the absence of light) at various temperatures. At predefined points of time, samples of prepared solutions were pulled for analysis according to the sample pull scheme provided in Table 28 and 29 for SEC and iCIEF, respectively. Numbers refer to number of vials that were stored/pulled for each buffer or excipients condition. Data is provided in Tables 30, 31 and 32.

Table 28: Sample Pull Scheme

	T0	7 days	6 months	12 months
5°C				1
25°C			1	
40°C		1		
50°C	1	1		

Table 29: Sample Pull Scheme

	T0	4 months	12 months
5°C		1	1
25°C		1	
40°C	1	1	

Table 30: Percentage monomer of PG110 samples formulated in various buffers and excipients after storage at specified temperatures and times (SEC data) (UB6 is 10 mM citrate, 10 mM phosphate pH 6; low-ionic means the protein is formulated in water without additional excipients added)

Buffer	T0	T7d 50°C	T7d 40°C	6 month 25°C	12 month 5°C
15 mM phosphate	98.38	93.84	97.92	94.73	93.84
15 mM acetate	98.45	94.19	97.92	95.41	97.46
15 mM citrate	98.35	93.92	98.03	95.35	97.49
15 mM succinate	98.44	94.08	98.08	95.08	97.4
15 mM histidine	98.58	94.25	98.2	95.29	97.59
15 mM arginine	98.5	93.17	98.16	96.37	97.79
Low-ionic	98.85	95.88	98.69	96.37	98.02
UB6+4% sorbitol	98.16	94.86	98.11	95.5	97.4
UB6+4% mannitol	98.05	94.91	98.05	95.34	97.45
UB6+8% sucrose	98.52	95.08	98.09	95.77	97.5
UB6+8% trehalose	98.45	94.96	98.06	95.33	97.3
UB6+0.01% Tween 80	98.43	93.98	97.88	92.78	96.76
UB6+2.5% glycerol	98.53	-----	97.74	95.2	97.24
UB6+15 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	98.35	94.79	98.07	95.17	97.26
UB6+20 mM NaCl	98.39	94.42	98	95.26	97.26
UB6+200 mM NaCl	98.4	94.58	98.12	95.04	97.04
UB6+0.01% Tween 20	98.42	94.08	97.84	94.66	97.23
UB6+0.1% Poloxamer	98.47	94.54	97.98	95.07	97.16

5

Table 31: Percentage aggregate of PG110 samples formulated in various buffers and excipients after storage at specified temperatures and times (SEC data) (UB6 is 10 mM citrate, 10 mM phosphate pH 6; low-ionic means the protein is formulated in water without additional excipients added).

10

Buffer	T0	T7d 50°C	T7d 40°C	6 month 25°C	12 months 5°C
15 mM phosphate	1.42	3.45	1.87	2.77	5.22
15 mM acetate	1.34	3.47	1.88	2.32	1.65
15 mM citrate	1.48	3.47	1.78	2.34	1.6
15 mM succinate	1.35	3.31	1.73	2.61	1.66
15 mM histidine	1.22	3.51	1.6	2.29	1.5
15 mM arginine	1.3	4.54	1.63	1.73	1.39
Low-ionic	0.95	1.53	1.07	1.61	1.01
UB6+4% sorbitol	1.67	3.13	1.71	2.16	1.63
UB6+4% mannitol	1.77	2.91	1.76	2.28	1.63
UB6+8% sucrose	1.31	2.76	1.73	1.98	1.59
UB6+8% trehalose	1.37	3	1.75	2.4	1.65
UB6+0.01% Tween 80	1.38	3.55	1.93	4.75	1.88
UB6+2.5% glycerol	1.29	-----	2.04	2.42	1.69
UB6+15 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	1.49	3.22	1.74	2.44	1.68

UB6+20 mM NaCl	1.43	3.33	1.81	2.26	1.63
UB6+200 mM NaCl	1.42	3.28	1.69	2.47	1.93
UB6+0.01% Tween 20	1.39	3.81	1.95	2.78	1.82
UB6+0.1% Poloxamer	1.34	3.32	1.83	2.49	1.76

5 **Table 32: Percentage fragment of PG110 samples formulated in various buffers and excipients after storage at specified temperatures and times (SEC data) (UB6 is 10 mM citrate, 10 mM phosphate pH 6; low-ionic means the protein is formulated in water without additional excipients added).**

Buffer	T0	T7d 50°C	T7d 40°C	6 month 25°C	12 month 5°C
15 mM phosphate	0.20	2.71	0.2	2.49	0.93
15 mM acetate	0.21	2.34	0.20	2.25	0.88
15 mM citrate	0.17	2.61	0.19	2.29	0.9
15 mM succinate	0.21	2.61	0.19	2.29	0.93
15 mM histidine	0.19	2.25	0.19	2.41	0.90
15 mM arginine	0.20	2.28	0.21	1.89	0.81
Low-ionic	0.20	2.59	0.24	2.52	0.95
UB6+4% sorbitol	0.17	2.01	0.18	2.33	0.96
UB6+4% mannitol	0.18	2.18	0.19	2.36	0.91
UB6+8% sucrose	0.17	2.16	0.19	2.23	0.89
UB6+8% trehalose	0.18	2.04	0.19	2.25	1.04
UB6+0.01% Tween 80	0.19	2.46	0.20	2.45	1.34
UB6+2.5% glycerol	0.18	-----	0.21	2.36	1.06
UB6+15 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	0.17	2	0.19	2.37	1.05
UB6+20 mM NaCl	0.17	2.25	0.19	2.46	1.09
UB6+200 mM NaCl	0.18	2.15	0.19	2.47	1.02
UB6+0.01% Tween 20	0.19	2.11	0.20	2.54	0.94
UB6+0.1% Poloxamer	0.18	2.14	0.19	2.42	1.07

Table 33: Percentage of various species of PG110 samples formulated in various buffers and excipients after storage at specified temperatures and times (iCIEF data) (UB6 is 10 mM citrate, 10 mM phosphate pH 6; low-ionic means the protein is formulated in water without additional excipients added).

4 month various temperatures		Area%			
Buffer		Acidic	Main	Basic	pI
15 mM Phosphate	5°C	33.74	57.22	9.05	6.94
	25°C	43.27	48.69	8.04	6.93
	40°C	86.30	8.26	5.44	6.91
15 mM Acetate	5°C	33.59	57.03	9.39	6.93
	25°C	43.25	48.71	8.04	6.93
	40°C	86.02	10.89	3.09	6.91
15 mM Citrate	5°C	33.05	57.54	9.41	6.96
	25°C	41.94	50.06	8.00	6.94
	40°C	85.38	11.27	3.35	6.93
15 mM Succinate	5°C	32.62	58.43	8.95	6.96
	25°C	41.29	50.55	8.16	6.96
	40°C	83.17	13.98	2.85	6.94
15 mM Histidine	5°C	32.79	57.99	9.22	6.99
	25°C	37.97	52.85	9.18	6.99
	40°C	70.99	21.43	7.59	6.98
15 mM Arginine	5°C	31.47	55.43	13.11	6.82
	25°C	39.09	49.00	11.91	6.80
	40°C	92.62	5.66	1.72	6.85
Low Ionic	5°C	33.48	57.45	9.07	7.00
	25°C	39.22	51.41	9.37	7.00
	40°C	74.02	19.15	6.83	6.99
UB6+4% Sorbitol	5°C	32.63	58.32	9.05	6.92
	25°C	42.57	49.25	8.18	6.92
	40°C	93.73	2.96	3.31	6.92
UB6+4% Mannitol	5°C	33.92	56.96	9.13	6.93
	25°C	46.64	45.87	7.49	6.92
	40°C	88.15	9.80	2.05	6.89
UB6+ 8% Sucrose	5°C	33.19	57.64	9.17	6.90
	25°C	43.62	48.52	7.86	6.88
	40°C	87.02	11.04	1.94	6.85
UB6+ 8% Trehalose	5°C	34.44	56.30	9.26	6.94
	25°C	48.41	44.27	7.33	6.93
	40°C	89.82	6.74	3.44	6.89
UB6+0.01% Tween 80	5°C	36.81	54.24	8.95	6.94
	25°C	90.56	7.36	2.08	6.93
	40°C	100.00	0.00	0.00	NA
UB6+2.5% glycerol	5°C	33.21	57.40	9.39	6.95
	25°C	41.22	50.31	8.47	6.94
	40°C	81.69	13.58	4.73	6.92
UB6+15 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	5°C	33.10	57.65	9.25	6.93
	25°C	42.47	49.07	8.46	6.92
	40°C	84.46	12.13	3.41	6.89
UB6+20 mM NaCl	5°C	41.19	48.50	10.31	6.81
	25°C	47.99	42.16	9.85	6.79

	40°C	84.56	12.51	2.93	6.77
UB6+200 mM NaCl	5°C	33.13	58.03	8.84	6.92
	25°C	43.32	48.12	8.56	6.92
	40°C	84.26	10.55	5.19	6.91
	5°C	33.71	57.18	9.11	6.93
UB6+0.01% Tween 20	25°C	43.57	48.18	8.25	6.93
	40°C	84.79	12.37	2.84	6.90
	5°C	34.02	56.77	9.21	6.93
UB6+0.1% Poloxamer	25°C	42.82	49.11	8.07	6.93
	40°C	84.80	12.90	2.30	6.90
12 months 5°C					
buffer		Acidic	Main	Basic	pI value
15 mM phosphate	5°C	38.194	53.23	8.576	7.12
15 mM acetate	5°C	38.226	53.21	8.564	7.09
15 mM citrate	5°C	37.955	53.81	8.235	7.14
15 mM succinate	5°C	37.633	53.88	8.487	7.16
15 mM histidine	5°C	36.612	54.71	8.678	7.13
15 mM arginine	5°C	36.923	52.25	10.827	6.99
Low-ionic	5°C	36.949	54.71	8.341	7.23
UB6+4% sorbitol	5°C	38.342	53.06	8.598	7.11
UB6+4% mannitol	5°C	39.883	51.58	8.537	7.11
UB6+8% sucrose	5°C	38.023	53.11	8.867	7.09
UB6+8% trehalose	5°C	38.92	52.75	8.33	7.11
UB6+0.01% Tween 80	5°C	48.371	44.8	6.829	7.12
UB6+2.5% glycerol	5°C	37.078	54.34	8.582	7.12
UB6+15 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	5°C	38.121	53.54	8.339	7.08
UB6+20 mM NaCl	5°C	42.232	49.73	8.038	6.9
UB6+200 mM NaCl	5°C	38.253	53.45	8.297	7.14
UB6+0.01% Tween 20	5°C	37.619	53.97	8.411	7.14
UB6+0.1% Poloxamer	5°C	38.145	53.13	8.725	7.15

PG110 stability decreased with increasing storage temperature which is expected behavior for all proteins. However, the data collected thus far indicate that formulating PG110 using phosphate, arginine or glycerol would result in potential denaturation.

- 5 After 50°C storage for 7 days with glycerol, no protein was detected via SEC, indicating all PG110 has been undergone physical instability and insoluble aggregate formation, thus avoiding SEC/UV detection.

10 **Example 9: Impact of Buffers and Formulation Excipients on the Stability of PG110 Formulations Stored at-80°C**

Findings from prior examples led to the decision that a formulation of 15 mM histidine and 0.01% tween 80 was optimal for the prevention of visible particle

formation in liquid formulations of the drug substance (Example 6). Tween 80 also prevented the formation of subvisible particles induced by freeze-thaw stress as detailed in Example 7. Accelerated stability testing (Example 8) also determined that the two excipients did not cause unacceptable levels of aggregation or fragmentation.

5 With this in mind, the next concern is whether the excipients cause destabilization of the drug substance when stored at -80°C. To test this, 150 µl solutions of PG110 at 1 mg/ml and 10 mg/ml in the original formulation (10 mM acetate 125 mM NaCl), 15 mM histidine pH 6, and 15 mM histidine pH 6 + 0.01% Tween 80 were prepped and stored at -80°C in cryovials. At 5 days, vials of each sample were removed
10 from storage and physicochemical degradation was quantitated by SEC. At 10 days, the remaining vial of each sample were removed and analyzed the same way. Tables 34, 35, and 36 contain the results of these experiments.

The data show that for formulations with histidine or histidine+tween 80 the % monomer increases from 0 to 5days and remains at that level at least until 10days. In
15 contrast, PG110 at 10 mg/ml in 10 mM acetate and 125 mM NaCl shows a steady decrease in % monomer from 0 to 5days to 10days which corresponds to an increase in % aggregate. Overall, the data indicate that a histidine+tween 80 formulation does not destabilize the drug substance when stored at -80°C.

20 **Table 34. Percentage monomer of PG110 samples formulated in various buffers and excipients after storage at -80°C (SEC data).**

Buffer	T0	T5d -80°C		T10d -80°C	
	ave	ave	sd	ave	sd
1 mg/ml 10 mM acetate 125 mM NaCl	98.24	98.31	0.01	98.38	0.02
10 mg/ml 10 mM acetate 125 mM NaCl	98.24	97.99	0.01	97.77	0.02
1 mg/ml histidine pH 6	98.22	98.38	0.07	98.42	0.03
10 mg/ml histidine pH 6	98.22	98.47	0.01	98.44	0.02
1 mg/ml histidine pH 6 + 0.01% tween80	98.16	98.43	0.01	98.38	0.02
10 mg/ml histidine pH 6 + 0.01% tween80	98.16	98.45	0.01	98.43	0.01

25 **Table 35. Percentage aggregate of PG110 samples formulated in various buffers and excipients after storage at -80°C (SEC data).**

Buffer	T0	T5d -80°C		T10d -80°C	
	ave	ave	sd	ave	sd
1 mg/ml 10 mM acetate 125 mM NaCl	1.58	1.50	0.01	1.33	0.00
10 mg/ml 10 mM acetate 125 mM NaCl	1.58	1.81	0.01	1.92	0.02
1 mg/ml histidine pH 6	1.59	1.42	0.06	1.29	0.01
10 mg/ml histidine pH 6	1.59	1.33	0.00	1.28	0.01
1 mg/ml histidine pH 6 + 0.01% tween80	1.65	1.35	0.01	1.31	0.00
10 mg/ml histidine pH 6 + 0.01% tween80	1.65	1.33	0.00	1.24	0.00

Table 36. Percentage fragment of PG110 samples formulated in various buffers and excipients after storage at -80°C (SEC data).

Buffer	T0	T5d -80°C		T10d -80°C	
	ave	ave	sd	ave	sd
1 mg/ml 10 mM acetate 125 mM NaCl	0.18	0.19	0.00	0.29	0.02
10 mg/ml 10 mM acetate 125 mM NaCl	0.18	0.20	0.00	0.31	0.00
1 mg/ml histidine pH 6	0.19	0.19	0.01	0.30	0.02
10 mg/ml histidine pH 6	0.19	0.19	0.01	0.29	0.01
1 mg/ml histidine pH 6 + 0.01% tween80	0.19	0.22	0.00	0.32	0.02
10 mg/ml histidine pH 6 + 0.01% tween80	0.19	0.21	0.01	0.34	0.01

The visual inspection data also showed that the histidine containing formulations
 5 even at 100 mg/mL did not contain visible particle formation even after 4 F/T cycles,
 further indicating that histidine is a very suitable excipient for maintaining PG110
 stability.

**Example 10: Impact Of freeze-thawing, stirring and accelerated stability testing
 10 On the Stability of PG110 in various formulations at various concentrations.**

The impact of excipients on PG110 stability was evaluated in various stress
 experiments:

- 1) repeated freeze-thaw processing (-80°C/30°C water bath);
- 2) Stirring to effectively exert stir stress and to increase the air-liquid interface to
 15 induce physical instability and PG110 degradation (6R glass vial, ambient
 temperature, approx. 9 mm Teflon coated stir bar, 550 rpm, up to 48 hrs stirring);
- 3) Accelerated stability testing: various samples were put on real-time and
 accelerated stability at 2-5°C, 25°C/60%relH and 40°C/60%relH, and the impact
 of protein concentration and stabilizing excipients on the content of native
 20 PG110 monomer was monitored by SEC/UV.

The following PG110 formulations and formulation compositions were tested:

Formulation 1: 52 mg/mL PG110, pH 6.0;

2.33 mg/mL Histidine;

5.0 mg/mL Sucrose;

25 20.0 mg/mL Mannitol; and

0.10 mg/mL Polysorbate 80.

Formulation 2: 52 mg/mL PG110, pH 6.0;

2.33 mg/mL Histidine;

46 mg/mL Sucrose; and

30 0.10 mg/mL Polysorbate 80.

Formulation 3: 52 mg/mL PG110, pH 6.0.;

2.33 mg/mL Histidine;

46 mg/mL Trehalose; and
0.10 mg/mL Polysorbate 80.

Formulation 4: 20 mg/mL PG110, pH 6.0;

2.33 mg/mL Histidine;

- 5 5.0 mg/mL Sucrose;
20.0 mg/mL Mannitol; and
0.10 mg/mL Polysorbate 80.

Formulation 5: 20 mg/mL PG110, pH 6.0;

2.33 mg/mL Histidine;

- 10 46 mg/mL Sucrose; and
0.10 mg/mL Polysorbate 80.

Formulation 6: 20 mg/mL PG110, pH 6.0;

2.33 mg/mL Histidine;

46 mg/mL Trehalose; and

- 15 0.10 mg/mL Polysorbate 80.

Freeze thaw stability of the ABT110 antibody at protein concentrations of 52 mg/mL and 20 mg/mL, were as follows after 2 and after 4 f/t cycles, respectively.

20

Table 37: Monomer content as determined by SEC/UV

	Form #1	Form #2	Form #3	Form #4	Form #5	Form #6
0 f/t	98.20	98.19	98.19	97.94	98.07	98.33
2 f/t	98.22	98.21	98.20	98.07	98.19	98.31
4 f/t	98.19	98.18	98.17	98.10	98.22	98.30

The foregoing data demonstrate that sucrose, trehalose and mannitol are well suited to maintain physical stability of PG110 during repeated f/t stress. Virtually no degradation was detected with regard to native PG110 monomer content throughout the stress experiment.

25

Stir stress stability of the ABT110 antibody at protein concentrations of 52 mg/mL and 20 mg/mL, were as follows after 24 and 48 hrs of stirring, respectively.

Table 38: Monomer content as determined by SEC/UV

	Form #1	Form #2	Form #3	Form #4	Form #5	Form #6
0 hrs	98.20	98.19	98.18	97.94	98.07	98.33
24 hrs	98.24	98.22	98.24	98.00	98.15	98.38
48 hrs	98.20	98.21	98.20	97.96	98.08	98.36

The foregoing data demonstrate that sucrose, trehalose and mannitol are well suited to maintain physical stability of PG110 during extensive stir stress. Virtually no degradation was detected with regard to native PG110 monomer content throughout the stress experiment.

- 5 Accelerated degradation kinetics of the ABT110 antibody at protein concentrations of 52 mg/mL and 20 mg/mL, were as follows after 14 days at 5°C and after 14 days at 50°C.

Table 39: Monomer content as determined by SEC/UV

	Form #1	Form #2	Form #3	Form #4	Form #5	Form #6
0 hrs	98.20	98.19	98.19	97.94	98.07	98.33
14 d, 5°C	98.19	98.11	98.21	97.92	97.97	98.30
14 d, 50°C	85.16	85.09	85.29	84.82	85.04	84.82

10

The foregoing data demonstrate that sucrose, trehalose and mannitol are well suited to maintain physical stability of PG110 during longer term storage. Even when exposed to 50°C for 14 days, more than 80% of native monomer was present in all samples tested.

15

Example 11: Long Term Stability of PG110 Lyophilized Powder Stored Under Various Conditions

- 20 The suitability of sucrose and mannitol as stabilizers during lyophilization and storage of PG110 was further studied. Two formulations of PG110 lyophilized powder for injection solution were placed under longer-term storage conditions (2-8°C), accelerated storage conditions of 25°/60% RH, and stress conditions of 40°C/75% RH and 50°C. These laboratory-scale drug product batches were produced and lyophilized from 130 L scale drug substance manufactured according to standard methods, for example, as shown in Table 40.

25

Table 40: Lyophilization Conditions for Formulations 1 and 2

Program Step	Shelf Temp [$\pm 2^{\circ}\text{C}$]	Pressure [mbar]	Time [h:min]
Loading	+20°C	Atm.	---
Freezing	+20° to 0°C	Atm.	0:20
	0°C	Atm.	2:10
	0°C to -45°C	Atm.	2:30
	-45°C	Atm.	3:00
Primary drying	-45°C	0.66 $\pm$ 0.01	1:00
	-45°C to -25°C	0.66 $\pm$ 0.01	1:00
	-25°C	0.66 $\pm$ 0.01	90:00
Secondary Drying	-25°C	0.36 $\pm$ 0.01	01:00
	-25°C to +25°C	0.36 $\pm$ 0.01	04:30
	+25°C	0.36 $\pm$ 0.01	08:00
Holding Step	+25°C to +5°C	0.36 $\pm$ 0.01	0:30
	+5°C	0.36 $\pm$ 0.01	---
Pre-aeration and closing	+5°C	About 500	---
Aeration	+5°C	Atm.	---

For testing, samples of the formulations were resuspended in sterile, distilled water at room temperature.

5

Formulation 1:

20 mg/mL PG110, pH 5.5

2.33 mg/mL histidine

70 mg/mL sucrose

0.1 mg/mL polysorbate 80

Formulation 2:

20 mg/mL PG110, pH 5.5

2.33 mg/mL histidine

10 mg/mL sucrose

30 mg/mL mannitol

10

0.1 mg/mL polysorbate 80

Test methods related to the quality, biological activity, and purity of the drug substance were performed at various time points to assess the stability profile of PG110 in each batch. The analytical methods used included:

15

- Appearance (visual)
- Particles (visual)
- Subvisible particles (light blockade)
- pH
- Imaged capillary isoelectric focusing (icIEF)
- SDS PAGE (reduced and nonreduced)
- Size Exclusion HPLC
- Product Specific Antigen Binding Assay
- Product Specific Functional Bioassay

20

Container closure integrity testing was performed using a dye penetration method in which the drug product vial was exposed to vacuum in a methylene blue solution, and then visually inspected for blue coloration. Water content was determined per USP, according to standard methods. Stability data obtained for samples from batch 1 and batch 2 are provided in Tables 41-48.

25

Table 41: Stability of PG110 Lyophilized Formulation 1 Stored at 2-8°C

Test	Procedure	Characteristics	Initial	1 month	3 months	6 months
Size exclusion HPLC (SE-HPLC)	HPLC	Aggregates [%]	1.6	1.7	1.6	1.6
		Fragments [%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
		Monomer [%]	98.3	98.3	98.3	98.4
Capillary isoelectric focusing (icIEF)	Isoelectric focusing	Sum acidic region [%]	33.7	33.3	32.8	32.5
		Main Peak [%]	56.2	57.1	57.3	58.9
		Sum basic region [%]	10.1	9.7	9.9	8.6
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE reducing)	SDS-Page (R)					
		Purity [%]	99.6	99.5	99.6	99.7
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE non-reducing)	SDS-Page (NR)					
		Purity [%]	92.3	92.2	91.8	90.6
		Band present at 97 kDa [%]	0.3	0.3	0.3	0.4
Particulate contamination - Sub-visible Particles	Subvis. Part. (LO)	Particles $\geq 10 \mu\text{m}$ [/container]	30	7	19	14
		Particles $\geq 25 \mu\text{m}$ [/container]	1	0	1	2

5 Table 42: Stability of PG110 Lyophilized Formulation 1 Stored at 25°C/60% RH

Test	Procedure	Characteristics	Initial	3 months	6 months
Size exclusion HPLC (SE-HPLC)	HPLC	Aggregates [%]	1.6	1.8	1.6
		Fragments [%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1
		Monomer [%]	98.3	98.2	98.4
Capillary isoelectric focusing (icIEF)	Isoelectric focusing	Sum acidic region [%]	33.7	34.0	31.7
		Main Peak [%]	56.2	57.2	59.2
		Sum basic region [%]	10.1	8.8	9.1
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE reducing)	SDS-Page (R)				
		Purity [%]	99.6	99.6	99.8
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE non-reducing)	SDS-Page (NR)				
		Purity [%]	92.3	92.1	90.6
		Band present at 97 kDa [%]	0.3	0.4	0.3
Particulate contamination - Sub-visible Particles	Subvis. Part. (LO)	Particles $\geq 10 \mu\text{m}$ [/container]	30	35	30
		Particles $\geq 25 \mu\text{m}$ [/container]	1	1	1

Table 43: Stability of PG110 Lyophilized Formulation 1 Stored at 40°C/75% RH

Test	Procedure	Characteristics	Initial	1 month	3 months	6 months
Size exclusion HPLC (SE-HPLC)	HPLC	Aggregates [%]	1.6	1.7	1.7	1.7
		Fragments [%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
		Monomer [%]	98.3	98.3	98.2	98.3
Capillary isoelectric focusing (icIEF)	Isoelectric focusing	Sum acidic region [%]	33.7	33.6	33.1	32.5
		Main Peak [%]	56.2	56.4	55.9	55.1
		Sum basic region [%]	10.1	10.0	11.0	12.3
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE reducing)	SDS-Page (R)					
		Purity [%]	99.6	99.6	99.5	99.7
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE non-reducing)	SDS-Page (NR)					
		Purity [%]	92.3	92.6	91.4	90.9
		Band present at 97 kDa [%]	0.3	0.3	0.2	0.5
Particulate contamination - Sub-visible Particles	Subvis. Part. (LO)	Particles $\geq$ 10 μ m [/container]	30	6	35	12
		Particles $\geq$ 25 μ m [/container]	1	0	1	1

5

Table 44: Stability of PG110 Lyophilized Formulation 1 Stored at 50°C

Test	Procedure	Characteristics	Initial	1 month
Size exclusion HPLC (SE-HPLC)	HPLC	Aggregates [%]	1.6	1.7
		Fragments [%]	< 0.1	< 0.1
		Monomer [%]	98.3	98.2
Capillary isoelectric focusing (icIEF)	Isoelectric focusing	Sum acidic region [%]	33.7	33.8
		Main Peak [%]	56.2	53.5
		Sum basic region [%]	10.1	12.7
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE reducing)	SDS-Page (R)			
		Purity [%]	99.6	99.6
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE non-reducing)	SDS-Page (NR)			
		Purity [%]	92.3	92.6
		Band present at 97 kDa [%]	-	-
Particulate contamination - Sub-visible Particles	Subvis. Part. (LO)	Particles $\geq$ 10 μ m [/container]	30	1
		Particles $\geq$ 25 μ m [/container]	1	0

Table 45: Stability of PG110 Lyophilized Formulation 2 Stored at 2-8°C

Test	Procedure	Characteristics	Initial	1 month	3 months	6 months
Size exclusion HPLC (SE-HPLC)	HPLC	Aggregates [%]	1.9	1.9	2	1,8
		Fragments [%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
		Monomer [%]	98.1	98	98	98.2
Capillary isoelectric focusing (icIEF)	Isoelectric focusing	Sum acidic region [%]	34.2	34	34	31.8
		Main Peak [%]	56.4	56.5	56.5	58.5
		Sum basic region [%]	9.5	9.5	9.5	9.6
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE reducing)	SDS-Page (R)					
		Purity [%]	99.6	99.4	99.5	99.5
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE non-reducing)	SDS-Page (NR)					
		Purity [%]	91.9	9.,7	90.7	90.2
		Band present at 97 kDa [%]	0.3	0.2	0.3	0.1
Particulate contamination - Sub-visible Particles	Subvis. Part. (LO)	Particles ≥ 10 µm [/container]	43	6	19	25
		Particles ≥ 25 µm [/container]	1	0	0	0

5

Table 46: Stability of PG110 Lyophilized Formulation 2 Stored at 25°C/60% RH

Test	Procedure	Characteristics	Initial	3 months	6 months
Size exclusion HPLC (SE-HPLC)	HPLC	Aggregates [%]	1,9	2,2	2,4
		Fragments [%]	< 0.1	< 0.1	< 0.1
		Monomer [%]	98,1	97,8	97,6
Capillary isoelectric focusing (icIEF)	Isoelectric focusing	Sum acidic region [%]	34,2	34,1	32,6
		Main Peak [%]	56,4	55,7	56,5
		Sum basic region [%]	9,5	10,2	10,9
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE reducing)	SDS-Page (R)				
		Purity [%]	99.6	99.5	99,4
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE non-reducing)	SDS-Page (NR)				
		Purity [%]	91,9	91,9	90,1
		Band present at 97 kDa [%]	0,3	0,3	0,3
Particulate contamination - Sub-visible Particles	Subvis. Part. (LO)	Particles ≥ 10 µm [/container]	43	28	26
		Particles ≥ 25 µm [/container]	1	0	1

Table 47: Stability of PG110 Lyophilized Formulation 2 Stored at 40°C/75% RH

Test	Procedure	Characteristics	Initial	1 month	3 months	6 months
Size exclusion HPLC (SE-HPLC)	HPLC	Aggregates [%]	1,9	3,1	5,2	8,4
		Fragments [%]	< 0.1	< 0.1	0.1	0.1
		Monomer [%]	98,1	96,9	94,8	91,6
Capillary isoelectric focusing (icIEF)	Isoelectric focusing	Sum acidic region [%]	34,2	34,6	33,6	39
		Main Peak [%]	56,4	47,8	33,8	21,4
		Sum basic region [%]	9,5	17,6	32,6	39,6
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE reducing)	SDS-Page (R)					
		Purity [%]	99,6	99,4	99,1	98,5
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE non-reducing)	SDS-Page (NR)					
		Purity [%]	91,9	92,4	89,3	84,5
		Band present at 97 kDa [%]	0,3	0,2	0,2	0,2
Particulate contamination - Sub-visible Particles	Subvis. Part. (LO)	Particles ≥ 10 µm [/container]	43	4	42	18
		Particles ≥ 25 µm [/container]	1	0	0	0

Table 48: Stability of PG110 Lyophilized Formulation 2 Stored at 50°C

Test	Procedure	Characteristics	Initial	1 month
Size exclusion HPLC (SE-HPLC)	HPLC	Aggregates [%]	1,9	6,2
		Fragments [%]	< 0.1	< 0.1
		Monomer [%]	98,1	93,8
Capillary isoelectric focusing (icIEF)	Isoelectric focusing	Sum acidic region [%]	34,2	33,7
		Main Peak [%]	56,4	33,5
		Sum basic region [%]	9,5	32,8
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE reducing)	SDS-Page (R)			
		Purity [%]		
SDS gel electrophoresis (SDS-PAGE non-reducing)	SDS-Page (NR)			
		Purity [%]	91,9	93
		Band present at 97 kDa [%]	0,3	0,2
Particulate contamination - Sub-visible Particles	Subvis. Part. (LO)	Particles ≥ 10 µm [/container]	43	2
		Particles ≥ 25 µm [/container]	1	0

5

All data on the samples from Formulations 1 and 2 stored at the intended storage conditions of 2 to 8°C, as well as the samples stored at 25°C and 40°C for 6 months meet the acceptance criteria and no significant changes were observed in any of the stability parameters testes at these temperatures. Storage at more extreme stress conditions

10 (50°C) for one month resulted in a decline in purity which was evident for icIEF only.

A comparison of Formulations 1 and 2 at 40°C over 6 months indicated that the PG110 antibody formulated with sucrose alone, demonstrated a higher level of stability than the antibody formulated with a combination of sucrose and mannitol (Figure 1). In addition, it was surprisingly observed that that the formation of subvisible and visible

15 particles in these formulations, which contain a molar ratio of sugar and/or polyol: protein greater than 1400 (*e.g.*, Formulation 1- protein:sugar = 1:1515; Formulation 2-

protein:sugar+polyol ratio = 1436), does not change over time, even at accelerated stability studies at 40°C.

Incorporation by Reference

5

The present invention incorporates by reference in their entirety techniques well known in the field of protein formulation. These techniques include, but are not limited to, techniques described in the following publications: Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Ausubel, F. M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X). Controlled Drug Bioavailability Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, N.Y., (1999); Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984); Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981; Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991); Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5); Krieglner, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, Mass. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X), Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Old, R. W. & S. B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4); Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3 (ISBN 0-87969-309-6); Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978; Winnacker, E. L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, N.Y. (translated by Horst Ibelgauf). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

10

15

20

25

30

35

Equivalents

The invention may be embodied in other specific forms without departing from the spirit or essential characteristics thereof. The foregoing embodiments are therefore to be
5 considered in all respects illustrative rather than limiting of the invention described herein. Scope of the invention is thus indicated by the appended claims rather than by the foregoing description, and all changes

SUMMARY OF SEQUENCE LISTING

SEQ ID NO: 1 (PG110 V_H)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGWAGGATDYN SALKSRFTISR
DNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLVTVSS

5

SEQ ID NO: 2 (PG110 V_L)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDY
TLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRFTFGQGTKVEIK

10 SEQ ID NO: 3 (PG110 V_H CDR 1)

GFSLTNNNVN

SEQ ID NO: 4 (PG110 V_H CDR 2)

GVWAGGATDYN SALKS

15

SEQ ID NO: 5 (PG110 V_H CDR 3)

DGGYSSSTLYAMDA

SEQ ID NO: 6 (PG110 V_L CDR 1)

20 RASEDIYNALA

SEQ ID NO: 7 (PG110 V_L CDR 2)

NTDTLHT

25 SEQ ID NO: 8 (PG110 V_L CDR 3)

QHYFHYPR

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

30 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

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

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
40 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

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

5 ATGGAATGGAGCTGGGTGTTCTTCTTCTGAGCGTGACCACCGGCGTGACACAGCGAGGTGC
 AGCTGGTCGAGAGCGGCGGAGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGCAGCCTGAGGCTGTCCTGCGCCGC
 CAGCGGCTTCAGCCTGACCAACAACAACGTGAACCTGGGTGCGGCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTG
 GAATGGGTGGGCGGCGTGTGGGCCGGGGGAGCCACCGACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGT
 TCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGA
 GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGGCGGCTACAGCAGCAGCACCCTGTACGCCATG
 10 GACGCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGT
 TCCCCCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAA
 GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGGGTGCAC
 ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCA
 GCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT
 15 GGACAAGAGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCCACCCTGCCCCCATGCCAGCCCCCGAGTTCCTG
 GGCGGACCCTCCGTGTTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC
 CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCAGGAAGATCCAGAGGTCCAGTTCAACTGGTA
 CGTGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTTAAACAGCACC
 TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT
 20 GCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCAGCTCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA
 GCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCACCCTCCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG
 TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG
 GCCAGCCCGAGAACAATAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCT
 GTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTTAGCTGCAGCGTG
 25 ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGAGCCTGGGCAAGTGA

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

30 MEWSWVFLFFLSVTITGVHSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGGVW
 AGGATDYNALKSRFTISRDNKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLVTVSSA
 STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
 SSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDLNGLKEYCKVSNKGLPSSIEK
 TISKAKQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 35 LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

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

40 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFTISR
 DNSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE
 STAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSN
 TKVDKRVESKYPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV
 EVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDLNGLKEYCKVSNKGLPSSIEKTI SAKAKQPREPQVYTLPP
 SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC
 45 SVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

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

50 ATGAGCGTGCCACCCAGGTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGCGACA
 TCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTG

CAGGGCCAGCGAGGACATCTACAACGCCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCC
AAGCTGCTGATCTACAACACCGACACCCTGCACACCGGCGTGCCAGCAGGTTACGCGGCAGCG
GCTCCGGCACC GACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTT
5 TTGCCAGCACTACTTCCACTACCC CAGGACCTTCGGCCAGGGCACC AAGGTGGAGATCAAGAGG
ACCGTGGCTGCCCCCAGCGTGTT CATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCG
CCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGA
CAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC
TACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT
10 GCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGCTG
A

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

15 MSVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNT
DTLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYA
CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDY
TLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C
25

We claim:

1. A pharmaceutical composition comprising:
 - (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody, or antigen binding fragment thereof;
 - 5 (b) a histidine buffer at a concentration of about 5 to about 60 mM; and
 - (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to about 0.1%;wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.
2. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein said composition comprises about 10 to about 30 mM histidine.
- 10 3. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the pH is about 5.5.
4. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the composition comprises about 0.01 % to about 0.02% polysorbate 80.
5. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the composition further comprises about 1 to about 100 mg/mL of a polyol.
- 15 6. The pharmaceutical composition of claim 5, wherein the polyol is selected from the group consisting of sorbitol and mannitol.
7. The pharmaceutical composition of claim 6, wherein the polyol is mannitol.
8. The pharmaceutical composition of claim 7, wherein the composition comprises about 10 to about 30 mg/mL mannitol.
- 20 9. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the composition further comprises about 10 to about 100 mg/mL of a sugar.
10. The pharmaceutical composition of claim 9, wherein the sugar is sucrose.
11. The pharmaceutical composition of claim 10, wherein the composition comprises about 10 to about 70 mg/mL sucrose.
- 25 12. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein said composition does not comprise a polyol or a sugar.
13. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein said composition does not comprise methionine.

14. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the concentration of the antibody, or antigen-binding portion thereof, is about 1 to about 240 mg/mL.
15. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein the concentration of the antibody, or antigen-binding portion thereof, is about 20 to about 120 mg/mL.
- 5 16. The pharmaceutical composition of any one of claims 1-11 and 13-15, wherein the molar ratio of (a) anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof, to (b) polyol, sugar, or combination thereof, is greater than 1:1400.
17. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein said composition
10 comprises:
 (a) about 20 mg/mL of the antibody, or antigen-binding portion thereof;
 (b) about 15 mM histidine; and
 (c) about 0.01% polysorbate 80;
wherein the pH of the formulation is about 5.5.
- 15 18. The pharmaceutical composition of claim 1, wherein said composition comprises:
 (a) about 60 mg/mL of the antibody, or antigen-binding portion thereof;
 (b) about 30 mM histidine; and
 (c) about 0.02% polysorbate 80;
20 wherein the pH of the formulation is about 5.5.
19. The pharmaceutical composition of claim 1, which is suitable for lyophilization.
20. A lyophilized pharmaceutical composition comprising:
 (a) about 1 to about 120 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding
fragment thereof;
25 (b) about 1 to about 10 mg of histidine; and
 (c) about 0.1 to about 0.4 mg of polysorbate 80.
21. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 20, wherein the composition comprises:
 (a) about 60 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof;
30 (b) about 4.7 mg of histidine; and
 (c) about 0.2 mg of polysorbate 80.
22. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 20, wherein the composition comprises:

- (a) about 20 mg of an anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof;
- (b) about 2.3 mg of histidine; and
- (c) about 0.1 mg of polysorbate 80.

23. The lyophilized pharmaceutical composition of any one of claims 20 to 22,
5 further comprising about 1 to about 100 mg of a polyol.
24. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 23, wherein the polyol is about 10 to about 50 mg mannitol.
25. The lyophilized pharmaceutical composition of any one of claims 20 to 24, further comprising about 1 to about 100 mg of a sugar.
- 10 26. The lyophilized pharmaceutical composition of claim 25, wherein the sugar is about 1 to 100 mg sucrose.
27. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the anti-NGF antibody, or antigen-binding portion thereof, binds to human NGF.
28. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the
15 anti-NGF antibody, or antigen-binding portion thereof, comprises a human IgG4 constant region.
29. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the anti-NGF antibody, or antigen-binding portion comprises a hinge region mutation.
30. The pharmaceutical composition of claim 29, wherein the hinge region mutation
20 comprises a mutation of a serine at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9.
31. The pharmaceutical composition of claim 29, wherein the serine at amino acid position 108 of SEQ ID NO: 9 is mutated to proline.
32. The pharmaceutical composition of claim 29, wherein the human IgG4 constant region comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 10.
- 25 33. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, 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; and
5 f) inhibits NGF-dependent PC12 cell neurite outgrowth.

34. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, does not exhibit a rebound effect when administered to a subject.

35. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the
10 antibody, or antigen-binding portion thereof, 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.

36. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the
15 antibody, or antigen-binding portion thereof, 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.

37. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, comprises a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1.

- 20 38. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, comprises a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

39. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the
25 antibody, or antigen-binding portion thereof, 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.

40. The pharmaceutical composition of any one of claims 1-26, wherein the
30 antibody, or antigen-binding portion thereof, comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13.

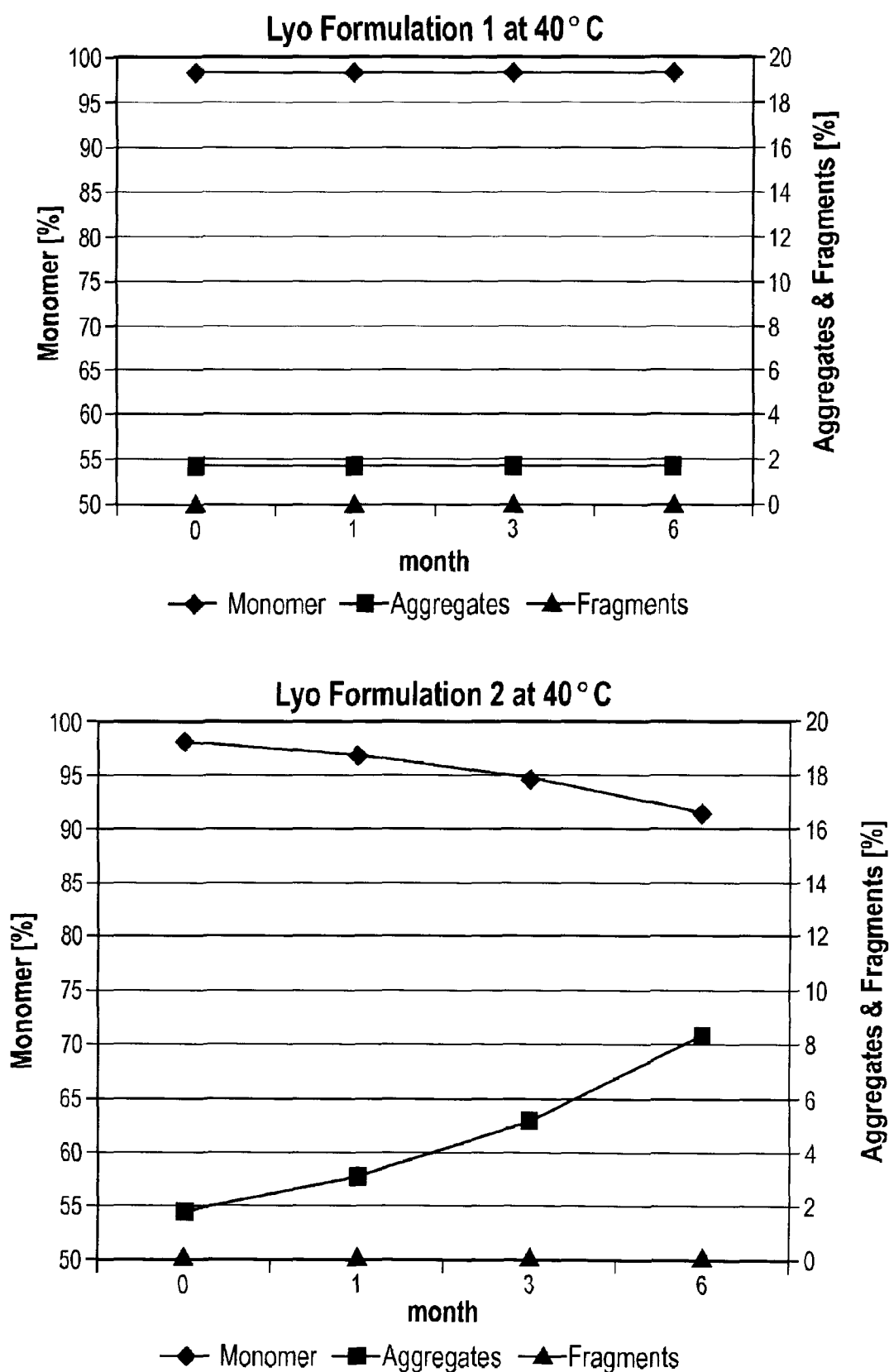
41. The pharmaceutical composition of any one claims 1-26 and 40, wherein the antibody, or antigen binding portion thereof, comprises a light chain comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16.
42. A pharmaceutical composition comprising:
- 5 (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody, or antigen binding fragment thereof, 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 having the
- 10 amino acid sequence of SEQ ID NO:10, wherein the concentration of the antibody, or antigen binding fragment thereof, is about 10 to about 50 mg/mL;
- (b) a histidine buffer at a concentration of about 10 to about 30 mM histidine; and
- (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to 0.02%;
- 15 wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.
43. A pharmaceutical composition comprising:
- (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising (i) a heavy chain variable region having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, (ii) a light chain variable region having the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, and (iii) a human
- 20 IgG4 constant region comprising a hinge region mutation at position 108 of SEQ ID NO: 9, wherein the concentration of the antibody, or antigen binding fragment thereof, is about 10 to about 50 mg/mL;
- (b) a histidine buffer at a concentration of about 10 to about 30 mM histidine; and
- 25 (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to 0.02%;
- wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.
44. A pharmaceutical composition comprising:
- (a) an anti-nerve growth factor (NGF) antibody comprising a human IgG4 constant region, wherein the antibody comprises a heavy chain having the amino acid
- 30 sequence of SEQ ID NO:13 and a light chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO:16, wherein the concentration of the antibody, or antigen binding fragment thereof, is about 10 to about 50 mg/mL;
- (b) a histidine buffer at a concentration of about 10 to about 30 mM histidine; and
- 35 (c) polysorbate 80 at a concentration of about 0.01% to 0.02%;
- wherein the pH of the composition is about 5.0 to about 6.0.

45. The pharmaceutical composition of any one of claims 42 to 44, further comprising about 10 to about 50 mg/mL mannitol.
46. The pharmaceutical composition of any one of claims 42 to 45, further comprising about 5 to about 70 mg/mL sucrose.
- 5 47. The pharmaceutical composition of any one of claims 42 to 44, consisting essentially of:
- (a) about 10 to 30 mg/mL of the antibody or antigen-binding fragment thereof;
 - (b) about 15 mM histidine buffer; and
 - (c) about 0.01% polysorbate 80;
- 10 wherein the pH of the composition is about 5.5.
48. The pharmaceutical composition of claim 45, consisting essentially of:
- (a) about 10 to 30 mg/mL of the antibody or antigen-binding fragment thereof;
 - (b) about 15 mM histidine buffer;
 - (c) about 0.01% polysorbate 80; and
 - 15 (d) about 10 to 30 mg/mL mannitol;
- wherein the pH of the composition is about 5.5.
49. The pharmaceutical composition of claim 46, consisting essentially of:
- (a) about 10 to 30 mg/mL of the antibody or antigen-binding fragment thereof;
 - (b) about 15 mM histidine buffer;
 - 20 (c) about 0.01% polysorbate 80; and
 - (d) about 40 to 70 mg/mL sucrose;
- wherein the pH of the composition is about 5.5.
50. The pharmaceutical composition of claim 46, consisting essentially of:
- 25 (a) about 10 to 30 mg/mL of the antibody or antigen-binding fragment thereof;
 - (b) about 15 mM histidine buffer;
 - (c) about 0.01% polysorbate 80;
 - (d) about 10 to 30 mg/mL mannitol; and
 - (e) about 5 to 10 mg/mL sucrose;
- 30 wherein the pH of the composition is about 5.5.
51. The pharmaceutical composition of any one of claims 42 to 50, wherein the ratio of antibody, or antigen binding fragment thereof, to polyol and or sugar is greater than 1:1400.

52. The pharmaceutical composition of any one of claims 42 to 51, wherein the pharmaceutical composition is lyophilized.
53. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the antibody, or antigen-binding portion thereof, is selected from the group consisting of a
5 monoclonal antibody, a human antibody, a humanized antibody, a chimerical antibody, a CDR-grafted antibody, a Fab, a Fab', a F(ab')₂, a Fv, a disulfide linked Fv, a scFv, a single domain antibody, a diabody, a multispecific antibody, a dual specific antibody, and a bispecific antibody.
54. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the
10 antibody, or antigen-binding portion thereof, is the antibody PG110.
55. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable in a liquid form for at least about 3 months.
56. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable in a liquid form for at least about 12 months.
- 15 57. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable for at least 3 months in a frozen or lyophilized form.
58. The pharmaceutical composition of claim 57, wherein the formulation is stable for at least 6 months in frozen or lyophilized form.
59. The pharmaceutical composition of claim 57, wherein the formulation is stable
20 for at least 12 months in a frozen or lyophilized form.
59. The pharmaceutical composition of claims 55 or 56, wherein the formulation is stored at 2-8°C.
60. The pharmaceutical composition of claims 57 or 58, wherein the formulation is stored frozen at -80°C.
- 25 61. The pharmaceutical composition of claims 57 or 58, wherein the formulation is stored in lyophilized form at 2-8°C.
62. The pharmaceutical composition of claims 57 or 58, wherein the formulation is stored in lyophilized form at room temperature.

63. The pharmaceutical composition of any one of claims 55 to 63, wherein there is less than about 10% aggregation of the antibody.
64. The pharmaceutical composition of any one of claims 55 to 63, wherein there is less than about 3% aggregation of the antibody.
- 5 65. The pharmaceutical composition of any one of the preceding claims, wherein the formulation is suitable for intravenous, subcutaneous and/or intramuscular administration.
66. A device comprising the pharmaceutical composition of any one of claims 1-65.
67. The device of claim 66, wherein the device is selected from the group consisting
10 of a syringe, a pen, an implant, a needle-free injection device, an inhalation device, and a patch.
68. An article of manufacture comprising the pharmaceutical composition or device of any one of claims 1-67.
69. Use of the pharmaceutical composition of any one of claims 1-65, or the device
15 of any one of claims 66-67, to treat an NGF mediated disease or condition.
70. The use of claim 69, wherein the NGF mediated disease or condition is pain.
71. The use of claim 70, 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
20 with chronic abacterial prostatitis, pain associated with endometriosis, pain associated with uterine fibroids and post-operative pain.
72. The use of any one of claims 69-71, wherein pharmaceutical compositions is suitable for administration of the anti-NGF antibody, or antigen binding fragment thereof at a dose in a range from 0.1 mg/kg to 10/mg/kg.
- 25 73. The use of any one of claims 69-72, wherein the pharmaceutical composition is suitable for administration intravenously, subcutaneously or intra-articularly.
74. The use of any one of claims 69-74, wherein the pharmaceutical composition is suitable for administration with a second pharmaceutical agent.

75. The use of claim 74, 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.
- 5

Figure 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/028659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/395 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/22 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) A61K 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, 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.
Y	US 2010/055097 A1 (KAISHEVA ELIZABET A [US] ET AL) 4 March 2010 (2010-03-04) page 7, paragraph 12 - paragraph 13; example 5	1-28, 33-39, 41,53-73
Y	WO 2006/131951 A2 (LAY LINE GENOMICS S P A [IT]; PAVONE FLAMINIA [IT]; MARTINELLI SARA [I] 14 December 2006 (2006-12-14) the whole document ----- -/--	1-28, 33-39, 41,53-73
☒ 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	
19 July 2011	26/07/2011	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Fellows, Edward	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2011/028659

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANGAL S ET AL: "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 30, no. 1, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 105-108, XP023620736, ISSN: 0161-5890, DOI: DOI:10.1016/0161-5890(93)90432-B [retrieved on 1993-01-01] the whole document	29-32, 40,42-52
A	----- WO 2006/110883 A2 (RINAL NEUROSCIENCE CORP [US]; ROSENTHAL ARNON [US]; SHELTON DAVID L [U]) 19 October 2006 (2006-10-19) the whole document -----	1-75

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2011/028659

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010055097 A1	04-03-2010	US 2003113316 A1	19-06-2003
		US 2006029599 A1	09-02-2006

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 A	27-11-2008
		JP 2008542440 A	27-11-2008
		KR 20080026593 A	25-03-2008
		US 2010291083 A1	18-11-2010
		US 2009208490 A1	20-08-2009

WO 2006110883 A2	19-10-2006	AR 055323 A1	15-08-2007
		AU 2006235559 A1	19-10-2006
		BR PI0610463 A2	22-06-2010
		CA 2604443 A1	19-10-2006
		CN 101217978 A	09-07-2008
		EP 1871416 A2	02-01-2008
		EP 2305711 A2	06-04-2011
		JP 2008535929 A	04-09-2008
		KR 20070119748 A	20-12-2007
		KR 20100135336 A	24-12-2010
		NZ 562229 A	30-04-2010
		US 2011033447 A1	10-02-2011
		ZA 200708362 A	30-12-2009

COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF)

Solicitud relacionada

Esta solicitud invoca prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EE.UU. N° 61/314.984, presentada el 17 de marzo, 2010, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El factor de crecimiento nervioso (NGF) es una proteína secretada que fue descubierta hace más de 50 años como una molécula que promueve la supervivencia y la diferenciación de las neuronas sensoriales y simpáticas. La cadena beta del NGF es la única responsable de la actividad estimulante del crecimiento nervioso del NGF. La cadena beta se homodimeriza y es incorporada en un complejo proteico más grande. El NGF es un miembro de una familia de factores neurotróficos conocidos como neurotrofinas. El NGF se une con gran afinidad a una quinasa receptora de tropomiosina conocida como TrkA. El NGF también tiene la capacidad de unirse a un receptor conocido como p75NTR, un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, que también interactúa con otras neurotrofinas. Se puede consultar una revisión de la estructura y la función del NGF, por ejemplo, en Sofroniew, M.V. et al., (2001) *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**: 1217-1281; Weismann, C. y de Vos, A.M. (2001) *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**: 748-759; Fahnstock, M. (1991) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **165**: 1-26.

Aunque el NGF fue identificado originalmente en virtud de su capacidad de promover la supervivencia y la diferenciación de las neuronas, hay cada vez más evidencias de que estos efectos sobre el desarrollo son tan solo un aspecto de la biología del NGF. En particular, se ha relacionado el NGF con la transmisión y el mantenimiento del dolor persistente o crónico. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración local y sistémica del NGF provoca hiperalgesia y alodinia (Lewin, G.R. et al. (1994) *Eur. J. Neurosci.* **6**:1903-1912). La administración intravenosa del NGF en seres humanos da como resultado migraña en

todo el cuerpo, mientras que la administración local evoca hiperalgesia y alodinia en el sitio de la inyección, además de los efectos sistémicos (Apfel, S.C. et al. (1998) *Neurology* 51: 695-702). Además, en determinadas formas de cáncer, el exceso de NGF facilita el crecimiento y la infiltración de fibras nerviosas, con la inducción de dolor debido al cáncer (Zhu, Z. et al. (1999) *J. Clin. Oncol.* 17: 241-228).

La participación del NGF en el dolor crónico ha suscitado un interés considerable en los enfoques terapéuticos basados en la inhibición de los efectos del NGF (véase, por ejemplo, Saragovi, H.U. y Gehring, K. (2000) *Trends Pharmacol. Sci.*, 21: 93-98). Por ejemplo, se ha usado una forma soluble del receptor de TrkA para bloquear la actividad del NGF, con lo cual se demostró que se reducía significativamente la formación de neuromas, responsables del dolor neuropático, sin dañar los cuerpos celulares de las neuronas dañadas (Kryger, G.S. et al. (2001) *J. Hand Surg. (Am.)*, 26: 635-644).

Otro enfoque para neutralizar la actividad del NGF comprende el uso de anticuerpos anti-NGF, y se han descrito ejemplos de estos anticuerpos (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO 2001/78698, WO 2001/64247, WO 2002/096458, WO 2004/032870, WO 2005/061540, WO 2006/131951, WO 2006/110883, la Patente de los EEUU N°: 7449616; las Publicaciones Patentes de los EE.UU. N°: US 20050074821, US 20080033157, US 20080182978 y US 20090041717). En modelos de dolor neuropático en animales (por ejemplo, el dolor producido mediante ligadura de los nervios troncales o espinales), la aplicación de una inyección sistémica de anticuerpos capaces de neutralizar el NGF previene la alodinia y la hiperalgesia (Ramer, M.S. y 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 una reducción significativa del dolor en un modelo de dolor provocado por cáncer en ratones (Sevcik, M.A. et al., (2005) *Pain*, 115: 128-141).

Las formulaciones anteriores que contienen anticuerpos anti-NGF (por ejemplo, PG110) han adolecido de la inestabilidad física del anticuerpo en la formulación, como queda

reflejado por fenómenos severos de formación y precipitación de partículas. Por consiguiente, persiste la necesidad en el arte de formulaciones que contengan anticuerpos anti-NGF que conserven la estabilidad física y con menor susceptibilidad de formación de partículas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención, se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de nuevas formulaciones que contienen anticuerpos anti-NGF (por ejemplo, el anticuerpo PG110 humanizado), donde dichas formulaciones son físicamente estables y no sufren de susceptibilidades de formación de partículas.

Por lo tanto, la presente invención provee composiciones farmacéuticas que comprenden: (a) un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), o un fragmento de unión al antígeno del mismo, (b) una solución amortiguadora de histidina a una concentración de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 60 mM; y (c) Polisorbato 80 a una concentración de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,1%; en donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0. En determinadas formas de realización, la composición comprende además un azúcar y/o un poliol, tal como se describe en la presente. En otras formas de realización, la composición no comprende un poliol o azúcar. En aún otras formas de realización, la composición no comprende metionina.

En determinadas formas de realización, en la presente invención se provee una composición farmacéutica que consiste o consiste esencialmente en (a) un anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso (NGF) o un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) un amortiguador de histidina en una concentración de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 60 mM y (c) polisorbato 80 en una concentración de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,1%, donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.

En determinadas formas de realización, en la presente invención se provee una

composición farmacéutica que consiste o consiste esencialmente en (a) un anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso (NGF) o un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) un amortiguador de histidina en una concentración de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 60 mM, (c) polisorbato 80 en una concentración de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,1% y (d) un poliol y/o un azúcar, donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.

En determinadas formas de realización, en la presente invención se provee una composición farmacéutica que consiste o consiste esencialmente en (a) un anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso (NGF) o un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) un amortiguador de histidina en una concentración de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 60 mM, (c) polisorbato 80 en una concentración de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,1% y (d) un poliol, donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.

En determinadas formas de realización, en la presente invención se provee una composición farmacéutica que consiste o consiste esencialmente en (a) un anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso (NGF) o un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) un amortiguador de histidina en una concentración de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 60 mM, (c) polisorbato 80 en una concentración de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,1% y (d) un azúcar, donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.

En determinadas formas de realización, la composición farmacéutica de la invención es una composición farmacéutica líquida. En otras formas de realización, la composición farmacéutica es apropiada para una liofilización. Por lo tanto, la invención provee además composiciones farmacéuticas liofilizadas que comprenden (a) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 240 mg de un anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión al antígeno del mismo; (b) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg de histidina; y (c) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,4 mg de Polisorbato 80. En

determinadas formas de realización, la composición liofilizada comprende además un azúcar y/o un poliol. En otras formas de realización, la composición liofilizada no comprende un poliol o un azúcar.

En determinadas formas de realización, en la presente invención se provee una composición farmacéutica que consiste o consiste esencialmente en (a) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 240 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg de histidina y (c) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,4 mg de polisorbato 80.

En otras formas de realización, en la presente invención se provee una composición farmacéutica que consiste o consiste esencialmente en (a) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 240 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg de histidina, (c) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,4 mg de polisorbato 80 y (d) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg de un poliol y/o entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg de un azúcar.

En otras formas de realización, en la presente invención se provee una composición farmacéutica que consiste o consiste esencialmente en (a) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 240 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg de histidina, (c) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,4 mg de polisorbato 80 y (d) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg de un poliol.

En aun otras formas de realización, en la presente invención se provee una composición farmacéutica que consiste o consiste esencialmente en (a) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 240 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg de histidina, (c) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,4 mg de polisorbato 80 y (d) entre

aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg de un azúcar.

En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-NGF, o una porción de unión al antígeno del mismo, se une al NGF humano. En otras formas de realización, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, comprende a región constante de la IgG4 humana, en donde la región constante de la IgG4 humana comprende una mutación en la región de bisagra. Preferentemente, la mutación en la región de la bisagra en la región constante de la IgG4 comprende una mutación de serina en la posición de aminoácido 108 de la SEQ ID N°: 9 (donde se ilustra la secuencia de aminoácidos de la región constante de la IgG4 humana de tipo salvaje). Más preferentemente, la serina en la posición del aminoácido 108 de la SEQ ID N°: 9 fue mutada por prolina. En una forma de realización preferida, la región constante de la IgG4 humana del anticuerpo anti-NGF comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10.

Un anticuerpo anti-NGF preferido contenido en las composiciones de la invención es el anticuerpo PG110: la secuencia de aminoácidos de su cadena pesada se detalla en SEQ ID N° 13 y la secuencia de aminoácidos de su cadena liviana se detalla en SEQ ID N° 16 de la invención. En otra forma de realización, la invención provee composiciones que contienen un anticuerpo anti-NGF que comprende una cadena pesada codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 11 y una cadena liviana codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 14. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 1 (que muestra la región variable de la cadena pesada de PG110). En otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 2 (que muestra la región variable de la cadena liviana de PG110). En aun otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID N° 2. En aun otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF compite por la unión al NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2.

En otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, 4 y 5, respectivamente (en donde las SEQ ID N°: 3, 4 y 5 muestran las CDR 1, 2 y 3 de la región variable de la cadena pesada, respectivamente, de PG110). En otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de la cadena liviana que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6, 7 y 8, respectivamente (donde en SEQ ID N°: 6, 7 y 8 se detallan las CDR 1, 2 y 3, respectivamente, de la región variable de la cadena pesada de PG110). En aun otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N°: 3, 4 y 5, respectivamente, y comprende una región variable de la cadena liviana que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N°: 6, 7 y 8, respectivamente.

En aún otras formas de realización, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, presenta una o más de las siguientes propiedades funcionales: a) se une al NGF humano pero no se une al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) humano, a la neurotrofina 3 (NT-3) humana o a la neurotrofina 4 (NT-4) humana; b) se une al NGF humano o de rata con una KD de 100 pM o menos; c) inhibe la unión del NGF a TrkA o a p75NTR; d) inhibe la proliferación de las células TF-1 dependiente del NGF; e) inhibe la supervivencia del ganglio de la raíz dorsal de pollo dependiente del NGF; f) inhibe el desarrollo de las neuritas de las células PC12 dependiente del NGF.

En aún otras formas de realización, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo

humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con injerto de CDR, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv ligado por disulfuro, un scFv, un anticuerpo de un solo dominio, un diabody, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo doble específico, un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo en el cual se han eliminado los epitopes de células T potenciales. En una forma de realización adicional, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, está humanizado.

En una forma de realización particularmente preferida, la invención provee composiciones que contienen un anticuerpo anti-NGF que presenta las siguientes características combinadas: una vida media de eliminación terminal extendida y una duración prolongada del alivio del dolor. Por lo tanto, la invención también provee un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de la IgG4 humana, en donde la región constante de la IgG4 humana comprende una mutación (preferentemente una mutación en la región de la bisagra), en donde el anticuerpo tiene una vida media de eliminación terminal en monomolgo de al menos 15 días, más preferentemente de al menos 21 y en donde el anticuerpo alivia el dolor durante un período de entre al menos aproximadamente una semana y aproximadamente doce semanas después de la administración de una sola dosis del anticuerpo a un sujeto.

La invención también se relaciona con métodos para inhibir la actividad del NGF en un sujeto humano que sufre de una enfermedad o condición relacionada con NGF mediante la administración al sujeto humano de una composición farmacéutica de la invención. En otras formas de realización, se administra un segundo agente farmacéutico, según se describe en la presente, al sujeto. En determinadas formas de realización, la enfermedad o condición relacionada con el NGF es dolor. Los ejemplos no limitativos de enfermedades y condiciones relacionadas con el NGF incluyen dolor inflamatorio, dolor postoperatorio, dolor neuropático, dolor provocado por fracturas, dolor de las articulaciones provocado por gota, neuralgia post-herpética, dolor provocado por cáncer, dolor provocado por osteoartritis o por artritis reumatoide, ciática, dolores asociados con

crisis provocadas por anemia falciforme, cefaleas, dismenorrea, endometriosis, dolor de la musculatura esquelética, dolor crónico en la parte inferior de la espalda, fibromialgia, torceduras, dolor visceral, quistes ováricos, prostatitis, cistitis, cistitis intersticial, dolor provocado por incisiones, migraña, neuralgia del trigémino, dolor provocado por quemaduras y/o por lesiones, dolor asociado con traumatismos, dolor asociado con las enfermedades de la musculatura esquelética, espondilitis anquilosante, patologías periarticulares, dolor provocado por metástasis de huesos, dolor provocado por VIH, eritromelalgia o dolor causado por pancreatitis o por cálculos renales. Otros ejemplos de enfermedades y condiciones relacionadas con el NGF incluyen melanoma maligno, síndrome de Sjogren y asma, tal como asma descontrolado con respuesta severamente exacerbada en las vías respiratorias y tos intratable. Las enfermedades y las condiciones particularmente preferidas para el tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención incluyen dolor inflamatorio (particularmente, dolor provocado por osteoartritis o por artritis reumatoidea), dolor de la musculatura esquelética (particularmente, dolor crónico en la parte inferior de la espalda), dolor neuropático (en particular, neuropatía diabética), dolor provocado por cáncer y dolor provocado por metástasis de huesos, cistitis intersticial/síndrome de la vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis y/o con fibroides uterinos y dolor postoperatorio. Preferentemente, el dolor se selecciona del grupo que consiste de dolor provocado por osteoartritis, dolor crónico en la parte inferior de la espalda, dolor neuropático de origen diabético, dolor provocado por cáncer, dolor provocado por metástasis de huesos, cistitis intersticial, síndrome de la vejiga dolorosa, dolor asociado con prostatitis abacteriana crónica, dolor asociado con endometriosis, dolor asociado con fibroides uterinos y dolor postoperatorio.

La composición farmacéutica se puede administrar, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea (por ejemplo, con una lanceta de inyección o con un implante subcutáneo), intramuscular o intraarticular, aunque en la presente se describen otras rutas de

administración apropiadas.

En la presente también se proveen conjuntos de elementos o artículos de manufactura que comprenden una composición farmacéutica de la invención.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es una comparación gráfica de la estabilidad de la formulación 1 y la formulación 2 en el tiempo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a composiciones mejoradas (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) de anticuerpos anti-NGF, o porciones de unión al antígeno de los mismos, que presentan una estabilidad mejorada. Las composiciones de la presente invención comprenden en general un anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, una solución amortiguadora adecuada (por ejemplo, una solución amortiguadora de histidina), un excipiente adecuado (por ejemplo, Polisorbato 80) y que tiene un pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0. Las composiciones de la presente invención pueden ser líquidas, adecuadas para una liofilización y/o liofilizadas.

Para que se pueda comprender más fácilmente la presente invención, primero se definirán algunos términos. En la descripción detallada se proveerán definiciones adicionales.

I. Definiciones

El artículo "un" y "una" se usan en la presente para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma tal que permite que la actividad biológica de uno o más ingredientes activos sea inequívocamente eficaz, y que no contenga componentes adicionales que puedan ser significativamente tóxicos para los sujetos a quienes se les administre la formulación.

La frase “vehículo farmacéuticamente aceptable” es reconocida en el arte e incluye un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, adecuado para su administración a mamíferos, tal como un ser humano. Dichos vehículos incluyen rellenos líquidos o sólidos, diluyentes, excipientes, solventes o materiales de encapsulamiento, que se puedan emplear para llevar o transportar el agente en cuestión desde un órgano o una porción del cuerpo a otro órgano o a otra porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación, y no debe ser nocivo o afectar la seguridad del sujeto humano.

Una “solución amortiguadora” se refiere a una solución amortiguada que resiste los cambios en el pH debido a la acción de sus componentes de conjugados ácido-base. Las soluciones amortiguadoras de la invención tienen un pH en el rango de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8. Los ejemplos de soluciones amortiguadoras que controlarán el pH en este rango incluyen fosfato, acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (por ejemplo, succinato de sodio), gluconato, glutamato, histidina, citrato y otras soluciones amortiguadoras de ácidos orgánicos.

El término “excipiente” se refiere a un agente que se puede agregar a una composición para proveer una consistencia deseada, por ejemplo, por alteración de las propiedades de volumen para mejorar la estabilidad y/o para ajustar la osmolalidad. Los ejemplos de excipientes que comúnmente se usan incluyen, pero en un sentido no limitativo, azúcares, polioles, aminoácidos, agentes tensioactivos y polímeros. Los “excipientes farmacéuticamente aceptables” (por ejemplo, vehículos, aditivos) son aquellos que pueden ser administrados razonablemente a un sujeto mamífero, por ejemplo un ser humano, para proveer una dosis eficaz del ingrediente activo empleado.

Según se usa en la presente, un “poliol” es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo, e incluye alcoholes de azúcares y ácidos de azúcares. Los polioles particulares tienen un peso molecular que es menor que aproximadamente 600 D (por ejemplo, en el rango de entre aproximadamente 120 y aproximadamente 400 kD). Los ejemplos no limitativos de

polioles incluyen fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa, glucosa, sorbosa, melezitosa, rafinosa, manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol, glicerol, L-gluconato y sus sales metálicas.

Un “azúcar” es un carbohidrato con un sabor característicamente dulce. Los azúcares se pueden clasificar como monosacáridos, disacáridos y polisacáridos. Los “monosacáridos” son los azúcares simples, por ejemplo, fructosa, levulosa, glucosa y dextrosa o un azúcar de uva. Los “disacáridos” incluyen lactosa o un azúcar lácteo, maltosa o azúcar de malta, un disacárido cristalino, sacarosa y trehalosa (también conocida como micoso o tremalosa). Con la hidrólisis, la molécula de disacárido da como resultado dos moléculas de monosacáridos. Los “polisacáridos” incluyen sustancias tales como celulosa, dextrina, glucógeno y almidón. Los polisacáridos son compuestos poliméricos constituidos por azúcares simples y se pueden hidrolizar para obtener azúcares simples. Los disacáridos se agrupan a veces con los polisacáridos más simples (habitualmente constituidos por tres o cuatro unidades de azúcares simples) para formar una clase de carbohidratos denominada “oligosacáridos”.

Un “azúcar” también se puede clasificar como un “azúcar reductor” o un “azúcar no reductor”. Los azúcares reductores se distinguen por el hecho que dados sus grupos aldehído o cetona libres, o potencialmente libres, tienen la propiedad de reducir fácilmente soluciones alcalinas reductoras de muchas sales metálicas, tales como las sales de cobre, plata, bismuto, mercurio y hierro. Los azúcares reductores incluyen, por ejemplo, maltosa, lactosa, celobiosa, gentiobiosa, melibiosa y turanosa. Los ejemplos no limitativos de azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, rafinosa, melezitosa, estaquiosa y verbascosa.

El término "agente tensioactivo" incluye en general aquellos agentes que protegen a una proteína en una composición contra los tipos de estrés inducidos por la interfase aire/solución y los tipos de estrés inducidos por la interfase solución/superficie. Por ejemplo, un agente tensioactivo puede proteger a la proteína contra la agregación. Los

agentes tensioactivos adecuados pueden incluir, por ejemplo, polisorbatos, alquil éteres de polioxietileno tal como Brij 35.RTM.; o poloxámeros, tales como Tween 20, Tween 80 o el poloxámero 188. Los detergentes preferidos son alquil éteres de polioxietileno, por ejemplo, Brij 35.RTM., Cremophor A25, Sympatens ALM/230; polisorbatos/Tweens, por ejemplo, Polisorbato 20, Polisorbato 80, Mirj y Poloxámeros, por ejemplo, Poloxámero 188, Poloxámero 407 y Tweens, por ejemplo, Tween 20 y Tween 80.

Una composición “estable” es una en la cual el ingrediente activo, por ejemplo un anticuerpo, en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o su estabilidad química y/o su actividad biológica durante el proceso de elaboración y/o con el almacenamiento. En la técnica se dispone de diversos procedimientos analíticos para medir la estabilidad de las proteínas, y se los analiza en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee, editor, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones (1993) *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90. ,

Un anticuerpo “retiene su estabilidad física” en una composición farmacéutica si no presenta sustancialmente señales de, por ejemplo, agregación, precipitación y/o desnaturalización, al realizarse un examen visual del color y/o de la transparencia, lo cual se puede medir mediante dispersión de luz UV o por cromatografía de exclusión por tamaño. La agregación es un proceso por el cual las moléculas de proteínas individuales, o complejos, se asocian de manera covalente o no covalente para formar agregados. La agregación puede avanzar hasta el límite que se forma un precipitado visible. La estabilidad física de una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo anti-NGF se puede determinar, por ejemplo, de acuerdo con el porcentaje de proteínas monoméricas en la solución, con un bajo porcentaje (por ejemplo, menos que un 3%) de proteína degradada (por ejemplo, fragmentada) y/o agregada lo que indica que la composición es estable.

Un anticuerpo “retiene su estabilidad química” en una composición farmacéutica de la invención, si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que el

anticuerpo aún retiene su actividad biológica, según se define a continuación. La estabilidad química se puede evaluar, por ejemplo, detectando y cuantificando químicamente las formas alteradas del anticuerpo. Una alteración química puede comprender la modificación del tamaño (por ejemplo, recorte) que puede ser evaluado usando, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o espectrometría de masa de tiempo de vuelo/ionización por desorción de láser asistido por matriz (MALDI/TOF MS). Otros tipos de alteración química incluyen una alteración de la carga (por ejemplo, como resultado de una desamidación u oxidación) que puede ser evaluada, por ejemplo, por cromatografía de intercambio iónico.

Un anticuerpo “retiene su actividad biológica” en una composición farmacéutica de la invención, si el anticuerpo en una composición farmacéutica es biológicamente activa para el propósito pretendido. Por ejemplo, la actividad biológica se retiene si la actividad biológica del anticuerpo en la composición farmacéutica se encuentra dentro de aproximadamente 30%, aproximadamente 20% o aproximadamente 10% (considerando los errores del ensayo) de la actividad biológica que presentaba la composición farmacéutica en el momento en que se la preparó (que se puede determinar, por ejemplo, en un ensayo de unión al antígeno). Las actividades biológicas de los anticuerpos anti-NGF de las formulaciones de la invención incluyen, pero en un sentido no limitativo, unión al NGF humano, inhibición de la unión del NGF a TrkA o p75NTR, inhibición de la proliferación dependiente del NGF de las células TF-1, inhibición de la supervivencia y diferenciación dependiente de NGF de las neuronas e inhibición de la transducción de dolor dependiente del NGF. El término "actividad" incluye además actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF que se une a un antígeno NGF.

El término “inhibición”, según 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, la “inhibición” puede hacer referencia a una disminución de

aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de la actividad biológica.

Los términos “factor de crecimiento nervioso” o “NGF” se usan indistintamente en la presente e incluyen variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos. Por ejemplo, en determinados casos, un anticuerpo específico para el NGF humano también puede reaccionar con el NGF de especies distintas del ser humano. En otras formas de realización, un anticuerpo específico del NGF humano puede ser completamente específico para el NGF humano y puede no presentar reactividad cruzada con el NGF de otras especies o una reactividad cruzada de otro tipo. El término “NGF humano” se refiere a la secuencia del NGF humano, tal como una que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena β del NGF humano, cuya forma precursora tiene el número de acceso en Genbank NP_002497, codificada por la secuencia de nucleótidos del número de acceso, Genbank NM_002506. La secuencia de la cadena β del NGF humano puede diferir de la cadena β del NGF humano con el N° de acceso en Genbank NP_002497 por presentar, por ejemplo, sustituciones conservadas o sustituciones en regiones no conservadas, donde la cadena β del NGF humano tiene sustancialmente la misma función biológica que la cadena β del NGF humano con el N° de acceso en Genbank NP_002497. El término “NGF de rata” se refiere a la secuencia del NGF de la rata, tal como una que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena β del NGF de la rata, cuya forma precursora tiene el número de acceso en Genbank XP_227525, codificada por la secuencia de nucleótidos con el número de acceso en Genbank XP_227525. El término “NGF de ratón” se refiere a la secuencia del NGF de ratón, tal como una que comprende la secuencia de aminoácidos de la cadena β del NGF de ratón, cuya forma precursora tiene el número de acceso en Genbank NP_038637, codificada por la secuencia de nucleótidos del número de acceso en Genbank NM_013609.

El término “receptor TrkA”, según se usa en la presente, se refiere a un receptor del NGF que también se conoce en el arte como el receptor de tropomiosina quinasa A o el

receptor de tirosina quinasa neurotrófica de tipo 1 (NTRK1). Los ejemplos no limitativos de secuencias del receptor TrkA humano incluyen las secuencias de aminoácidos con los números de acceso en Genbank NP_001012331 (isoforma 1), NP_002520 (isoforma 2) y NP_001007793 (isoforma 3).

El término “receptor p75NTR”, según se usa en la presente, se refiere a un receptor de neurotrofina que tiene un peso molecular de aproximadamente 75 kDa, que se une al NGF y a otras neurotrofinas y que se describe, por ejemplo, en Bothwell, M. (1996) *Science* 272: 506-507. Un ejemplo no limitativo de una secuencia del receptor p75NTR humano es la secuencia de aminoácidos con el número de acceso en Genbank NP_002498, codificada por la secuencia de nucleótidos del número de acceso en Genbank NM_002507.

El término “vida media de eliminación terminal”, según se usa en la presente con relación a los anticuerpos anti-NGF, se refiere a la cantidad de tiempo necesaria para que la concentración del anticuerpo, medida en el suero del sujeto al que se le ha administrado el anticuerpo, se reduzca a la mitad, una vez completadas la absorción y la redistribución del anticuerpo. Cuando se use un grupo de sujetos, se podrá usar la media geométrica de la vida media de eliminación terminal en los sujetos como una medida de la vida media de eliminación terminal del anticuerpo.

El término “vida media farmacológica”, según se usa en la presente con respecto a los anticuerpos anti-NGF, se refiere a la cantidad de tiempo promedio para conservar el efecto de la droga in vivo (MRT para el efecto de la droga). Se puede calcular como la relación del área de la primera curva de tiempo-efecto corregida para el nivel basal (AUMEC) versus el efecto de la droga corregido para el nivel basal acumulado en el tiempo (área bajo la curva de efecto-tiempo, AUEC), usando la siguiente fórmula:

$$\text{Vida media farmacológica} = \frac{\text{AUMEC}}{\text{AUEC}} = \frac{\int E(t)tdt}{\int E(t)dt}$$

Cuando se usa un grupo de sujetos, se podrá emplear la media geométrica de la vida

media farmacológica en los sujetos como una medida de la vida media farmacológica del anticuerpo.

El término “inhibición”, según 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, la “inhibición” se puede referir a una disminución de aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de la actividad biológica.

Los términos “anticuerpo” o “inmunoglobulina”, usados indistintamente en la presente, incluyen anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, una “porción de unión al antígeno”) o cualquier cadena individual de los mismos que retenga capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, NGF). En un anticuerpo completo, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada HCVR o VH en la presente) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de dicha cadena liviana (abreviada LCVR o VL en la presente) y una región constante de dicha cadena liviana. La región constante de la cadena liviana consiste en un dominio CL. Las regiones VH y VL pueden dividirse además en regiones hipervariables, conocidas como regiones determinantes de complementariedad (CDR), y separadas por regiones conservadas conocidas como regiones de marco de trabajo (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas, desde el extremo amino-termina hacia el extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y liviana contienen un dominio de unión que interactúa con el antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o los factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, las células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Las moléculas de

inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG 1, IgG2, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

El término "porción de unión al antígeno" o "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo") hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, NGF). Estas formas de realización de anticuerpos también pueden tener formatos biespecíficos, de especificidad doble o multiespecíficos; uniéndose específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados por el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos entre sí en la región bisagra a través de un enlace disulfuro; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios FL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546, Winter et al., publicación PCT WO 90/05144 A1), que comprende un solo dominio variable; y (vi) una región de determinación de la complementariedad (CDR) aislada. Aún más, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite obtenerlas como una sola cadena proteica en la cual las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); véase por ejemplo, Bird et al., (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883. También se incluyen otras formas de anticuerpos, tales como los diacuerpos [diabodies]. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos, en donde los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena de polipéptidos, pero usando un conector que es demasiado corto para que los dos dominios se combinen en la misma cadena, forzando de esta manera el apareamiento de dichos dominios con dominios

complementarios de una cadena diferente y la formación de dos sitios de unión al antígeno (véanse, por ejemplo, Holliger et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak et al., (1994) *Structure* 2: 1121-1123). Tales anticuerpos de cadena simple también se consideran incluidos en el término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo como es de conocimiento en el arte (Kontermann y Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag, Nueva York, 790 (ISBN 3-540-41354-5).

El término "mutación en la región de la bisagra", según se usa en la presente, se refiere a una mutación, tal como una mutación puntual, una sustitución, una adición o una supresión, en la región de la bisagra del dominio constante de una inmunoglobulina.

El término "anticuerpo monoclonal", según se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, donde los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos, excepto por las posibles mutaciones naturales que pudieran estar presentes en cantidades mínimas. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, ya que están dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que típicamente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra determinantes (epitopes) diferentes, cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante en el antígeno. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando cualquier procedimiento reconocido en el arte, por ejemplo, un método con hibridomas, como se describe en Kohler et al. (1975) *Nature*, 256: 495, un animal transgénico, como se describe, por ejemplo en Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859, métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 4816567), o usando bibliotecas de anticuerpos en fagos, con procedimientos como los que se describen, por ejemplo, en 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 ser naturales o se pueden producir de manera recombinante.

El término “anticuerpo recombinante” se refiere a anticuerpos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrómico para genes de inmunoglobulinas (por ejemplo, genes de inmunoglobulinas humanas), o de un hibridoma preparado a partir de dicho animal, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de combinación de anticuerpos recombinantes (por ejemplo, una que contiene secuencias de anticuerpos) usando una presentación en fagos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que comprenda la separación de secuencias de genes de inmunoglobulinas (por ejemplo, genes de inmunoglobulinas humanas) de otras secuencias de ADN. Estos anticuerpos recombinantes pueden tener regiones variables y constantes derivadas de secuencias de la línea germinal de la inmunoglobulina humana. Sin embargo, en determinadas formas de realización, estos anticuerpos humanos recombinantes pueden ser sometidos a una mutagénesis in vitro, por lo que las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan de secuencias de la línea germinal de VH y VL humanas y están relacionadas con ellas, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

El término inmunoglobulina o anticuerpo “quimérico” se refiere a una inmunoglobulina o a un anticuerpo cuyas regiones variables derivan de una primera especie y cuyas regiones constantes derivan de una segunda especie. Las inmunoglobulinas o los anticuerpos quiméricos se pueden construir, por ejemplo, mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulinas que pertenecen a distintas especies.

Los términos “anticuerpo humanizado” e “inmunoglobulina humanizada” hacen referencia a un anticuerpo o a una inmunoglobulina que incluye al menos una cadena de un anticuerpo o una inmunoglobulina humanizada (es decir, al menos una cadena liviana o

pesada humanizada). Los términos “cadena de inmunoglobulina humanizada” y “cadena de anticuerpo humanizada” (es decir, una “cadena liviana de inmunoglobulina humanizada” o una “cadena pesada de inmunoglobulina humanizada”) hacen referencia a una cadena de inmunoglobulina o de anticuerpo (es decir, una cadena liviana o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región de marco de trabajo variable, que proviene sustancialmente de una inmunoglobulina o de un anticuerpo humano, y regiones determinantes de complementariedad (CDR) (por ejemplo, al menos una CDR, preferentemente dos CDR, más preferentemente tres CDR), que sustancialmente provienen de una inmunoglobulina o un anticuerpo no humano, y que también incluye regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o una porción de la misma en el caso de una cadena liviana, y preferentemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). El término “región variable humanizada” (por ejemplo, una “región variable de la cadena liviana humanizada” o una “región variable de la cadena pesada humanizada”) se refiere a una región variable que incluye una región de marco variable, que sustancialmente proviene de una inmunoglobulina o un anticuerpo humano, y regiones determinantes de complementariedad (CDR), que sustancialmente provienen de una inmunoglobulina o un anticuerpo no humano.

En una forma de realización, el término “anticuerpo humanizado” es un anticuerpo, o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo, que se une inmuno específicamente a un antígeno de interés y que comprende una región de marco de trabajo (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) que presenta sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Según se usa en la presente, el término “sustancialmente”, en el contexto de una CDR, se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la CDR de un anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la

totalidad de al menos uno, y típicamente dos dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv), donde la totalidad o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana (es decir, el anticuerpo donante), y la totalidad o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. En una forma de realización, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas formas de realización, un anticuerpo humanizado contiene la cadena liviana y al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En una forma de realización, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena liviana humanizada. En otra forma de realización, un anticuerpo humanizado solamente contiene una cadena pesada humanizada. En una forma de realización particular, un anticuerpo humanizado solamente contiene un dominio variable humanizado de una cadena liviana y/o de una cadena pesada humanizada. El anticuerpo humanizado se puede seleccionar entre cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo incluyendo, en un sentido no limitativo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y los dominios constantes particulares pueden seleccionarse con el fin de optimizar las funciones efectoras deseadas usando procedimientos bien conocidos en el arte.

El término "epitope" incluye cualquier determinante x (por ejemplo, un polipéptido) capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina. En determinadas formas de realización, los determinantes de epitopes incluyen agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa, tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilos, sulfonilos y, en determinadas formas de realización, pueden tener características específicas de su estructura tridimensional y/o características de carga específicas. Un epitope es una región de un antígeno donde se une a un anticuerpo. En

determinadas formas de realización, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce de forma preferencial su antígeno blanco en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término “anticuerpo humano”, según se usa en la presente, pretende incluir los anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales las regiones de marco de trabajo y las CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana, como se describe, por ejemplo, en Kabat et al. (véase Kabat, et al. (1991) *Sequences of proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU. [U.S. Department of Health and Human Services], Publicación del NIH N° 91-3242). Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica del sitio in vitro o mediante una mutación somática in vivo). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, según se usa en la presente, no incluye anticuerpos donde se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como el ratón, en secuencias de regiones de marco de trabajo humanas.

Un “anticuerpo aislado”, según se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que pudieran tener distintas especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al NGF está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del NGF). Además, un anticuerpo aislado típicamente está sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o sustancias químicas.

Según se usan en la presente, los términos “unión específica”, “se une específicamente”, “unión selectiva” y “se une selectivamente” indican que un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, presentan una afinidad considerable por un antígeno o un

epitope particular, y que generalmente no presentan una reactividad cruzada significativa con otros antígenos o epitopes. Una unión “considerable” o preferida incluye una unión con una afinidad de al menos 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 M-1 ó 10^{10} M-1. Se prefieren en mayor medida las afinidades mayores que 10^7 M-1, preferentemente aquellas mayores que 10^8 M-1. Dentro del alcance de la presente invención también se contemplan valores intermedios con relación a los detallados en la presente, por lo que una afinidad de unión preferida se puede representar como un rango de afinidades, por ejemplo, de entre 10^6 y 10^{10} M-1, preferentemente entre 10^7 y 10^{10} M-1, más preferentemente entre 10^8 y 10^{10} M-1. Un anticuerpo que “no presenta una reactividad cruzada significativa” es uno que no se unirá de manera considerable a una entidad indeseable (por ejemplo, una entidad proteica indeseable). La unión específica o selectiva se puede determinar de acuerdo con cualquier medio reconocido en el arte para determinar dicha unión, incluyendo, por ejemplo, un análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva.

El término “KD”, según se usa en la presente, se refiere a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular o la afinidad de un anticuerpo por un antígeno obtenida, por ejemplo, con una medición por titulación en el equilibrio o dividiendo la constante de la velocidad de disociación (koff) por la constante de velocidad de asociación (kon). La constante de velocidad de asociación (Kon), la constante de velocidad de disociación (Koff) y la constante de disociación en equilibrio se usan para representar la afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno. Los métodos para determinar las constantes de velocidad de asociación y disociación son bien conocidos en el arte. Las técnicas basadas en fluorescencia ofrecen una sensibilidad elevada y la capacidad de examinar muestras en soluciones amortiguadoras fisiológicas en equilibrio. Se pueden usar otros enfoques e instrumentos experimentales, tales como el ensayo BIAcore® (análisis de interacción biomolecular), (por ejemplo, los instrumentos disponibles de BIAcore International AB, una compañía de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Además, también se puede usar un ensayo KinExA® (ensayo de exclusión

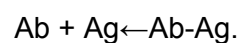
cinética), disponible de Sapidyn Instruments (Boise, Idaho).

En una forma de realización, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención se une al antígeno (por ejemplo, NGF) con una afinidad (KD) 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), lo cual se puede medir usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular. En una forma de realización preferida, el anticuerpo se une al NGF con una afinidad (KD) en un rango de aproximadamente 25-35 pM.

Los términos "Kass", "Ka" "Kon", según se usan en la presente, se refieren a la constante de la velocidad de asociación para la asociación de un anticuerpo en el complejo de anticuerpo/antígeno. Este valor indica la velocidad de unión de un anticuerpo con su antígeno blanco o la velocidad de formación de un complejo entre un anticuerpo y el antígeno, según se muestra de acuerdo con la siguiente ecuación:



Los términos "Kdiss", "Kd" y "Koff", según se usan en la presente, se refieren a la constante de la velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo en el complejo del anticuerpo/antígeno. Este valor indica la velocidad de disociación de un anticuerpo de su antígeno blanco o la separación del complejo Ab-Ag en el tiempo, en el anticuerpo y antígeno libres según se muestra con la siguiente ecuación:



El término "IC50", según se usa en la presente, se refiere a la concentración de un anticuerpo que inhibe una respuesta, en un ensayo in vitro o in vivo, hasta un nivel que es el 50% de la respuesta de inhibición máxima, es decir, la mitad del rango entre la respuesta de inhibición máxima y la respuesta en ausencia de tratamiento.

Los términos "tratar" y "tratamiento", según se usan en la presente, hacen referencia a las medidas terapéuticas preventivas que se describen en la presente. En los métodos de

“tratamiento” se emplea la administración de un anticuerpo de la presente invención a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que sufre una enfermedad o una condición relacionada con el NGF, con el fin de prevenir, curar o demorar la enfermedad o la condición, reducir la severidad de la enfermedad o de la condición o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o de la condición.

El término “enfermedad o condición relacionada con el NGF”, según se usa en la presente, se refiere a enfermedades y a condiciones donde está presente la actividad del NGF, a enfermedades y condiciones asociadas con dicha actividad o a enfermedades y a condiciones donde dicha actividad interviene en uno o más de los síntomas pertinentes o los promueve.

Según se usa en la presente, el término “sujeto” incluye cualquier ser humano o cualquier animal no humano. En una forma de realización particular, el sujeto es un ser humano. El término “animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Según se usa en la presente, el término “efecto de rebote” se refiere a la eficacia disminuida de los agentes que secuestran el NGF, tal como un anticuerpo anti-NGF, que aparece en un sujeto después de un período inicial de efectividad posterior a una administración única o repetida. Por ejemplo, el tratamiento con un anticuerpo anti-NGF puede aliviar inicialmente el dolor, por ejemplo, un dolor debido a una inflamación, a daños en los nervios o a otra etiología, pero posteriormente es seguido por un período de eficacia analgésica disminuida donde el dolor eventualmente se torna tanto o más intenso que antes del tratamiento. En otro ejemplo, un anticuerpo anti-NGF puede presentar una efectividad inicial en un sujeto durante un período después de una administración única o repetida, tal como un período de una semana después de la administración (por ejemplo, durante los días 1-7 después de la administración), a lo que sigue un período de eficacia disminuida, tal como un período de 1-2 semanas después de la administración (por

ejemplo, los días 7-14 después de la administración). Este período de “rebote” puede estar seguido por un período donde se recupera la eficacia del anticuerpo anti-NGF. Por ejemplo, puede haber un perfil de analgesia bifásico después de una administración única o repetida de un anticuerpo anti-NGF, con un período intermedio de eficacia reducida, o incluso con una sensación de dolor exagerada. Este efecto de rebote se puede evaluar, por ejemplo, en estudios clínicos del dolor, en modelos experimentales del dolor y/o en otros modelos de la eficacia anti-NGF. Este efecto de rebote puede estar asociado, por ejemplo, con un dolor incrementado y/o con acontecimientos adversos incrementados (tales como sensaciones anormales, que varían entre la alodinia y la disestesia, la parestesia y la hiper o hipoestesia) en el sujeto durante el período de rebote. Aunque no se pretende limitar la invención por un mecanismo, el efecto de rebote podrá ser causado por una expresión alterada del NGF, por una expresión o una señalización alterada del receptor TrkA o p75 o por cualquier otro mecanismo que de como resultado una eficacia disminuida de manera transitoria, después del período de eficacia inicial que haya sido consecuencia de una administración única o repetida de un anticuerpo anti-NGF.

En las siguientes subsecciones se describirán con mayor detalle diversos aspectos de la invención.

II. Composiciones farmacéuticas de la invención

En la presente invención se proveen composiciones farmacéuticas líquidas y liofilizadas que comprenden un anticuerpo anti-NGF o un fragmento de unión al antígeno de éste, que tiene propiedades mejoradas en comparación con las composiciones reconocidas en la técnica. Las composiciones de la invención permiten mantener la solubilidad y la estabilidad del anticuerpo anti-NGF o del fragmento de unión al antígeno de éste, por ejemplo, durante la manufactura, el almacenamiento y/o los pasos de procesamiento repetidos de congelación/descongelación, o durante la exposición extendida a interfases de aire-líquido incrementadas (por ejemplo, no presentan una opalescencia, una agregación o una precipitación significativa). Por ejemplo, las composiciones de la

invención mantienen un nivel bajo de agregación de proteínas (es decir, menos de 3%) a pesar de contener cantidades elevadas (por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 240 mg/ml) del anticuerpo o del fragmento de unión al antígeno de éste. Las composiciones de la invención también mantienen una viscosidad baja, dentro de rangos apropiados para la inyección subcutánea, a pesar de contener grandes cantidades (por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 240 mg/ml) del anticuerpo. Además, las composiciones de la invención mantienen la solubilidad, mantienen una viscosidad baja, apropiada para la inyección subcutánea o intravenosa, y mantienen la estabilidad en un rango de pH, por ejemplo, de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0. Por consiguiente, las composiciones de anticuerpos de la invención superan una cantidad de desafíos conocidos para las composiciones de anticuerpos, que incluyen desafíos relacionados con la estabilidad, la viscosidad, la turbidez y la degradación física.

Por ende, en un aspecto, las composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo anti-NGF o un fragmento de unión al antígeno de éste, un amortiguador y un excipiente que son suficientes para mantener la estabilidad del anticuerpo anti-NGF o del fragmento de unión al antígeno de éste en una forma líquida y/o liofilizada.

En la presente se describen en detalle anticuerpos anti-NGF y fragmentos de unión al antígeno de éstos que pueden usarse en las composiciones de la invención, así como métodos para elaborar dichos anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno de éstos. La cantidad del anticuerpo presente en la composición se determina, por ejemplo, teniendo en cuenta las dosis, los volúmenes y los modos de administración deseados. En determinadas formas de realización de la invención, las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones líquidas y/o liofilizadas (al reconstituirlas) comprenden una concentración de proteínas de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 240 mg/ml, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 120 mg/ml, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 240 mg/ml, aproximadamente 50-150 mg/ml, entre aproximadamente

15 y aproximadamente 75 mg/ml o entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 mg/ml de los anticuerpos anti-NGF humano o de los fragmentos de unión al antígeno de éstos. Aunque las formas de realización preferidas de la invención son composiciones que comprenden concentraciones de proteínas elevadas, también se contempla la posibilidad de que las composiciones de la invención comprendan una concentración del anticuerpo de entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 240 mg/ml, entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml, entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml o entre aproximadamente 30 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml. En una forma de realización de la invención, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 100 mg/ml. En una forma de realización de la invención, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 60 mg/ml. En una forma de realización de la invención, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 30 mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 20 mg/ml. En otra forma de realización, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml. En otra forma de realización de la invención, las composiciones comprenden una concentración del anticuerpo de aproximadamente 55 mg/ml.

Dentro del alcance de esta invención también se contemplan los rangos intermedios, por ejemplo, de los rangos mencionados con anterioridad, tales como 75-90 mg/ml. Por ejemplo, han de quedar incluidos los rangos de valores donde se use una combinación de cualquiera de los valores mencionados con anterioridad como límites superiores y/o inferiores. Dentro del alcance de esta invención también se contemplan las concentraciones intermedias de las cantidades y las concentraciones que se mencionaron con anterioridad para el anticuerpo anti-NGF (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78,

79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239 o aproximadamente 240 mg/ml).

En algunas formas de realización de la invención, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 1-100 mg, 1-75 mg, 1-55 mg, 1-30 mg, 1-20 mg, 1-10 mg, 10-20 mg, 15-75 mg, 100-150 mg, 110-150 mg, 100-140 mg, 110-140 mg, 120-140 mg, 130-140 mg del anticuerpo anti-NGF. En otras formas de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 40-240, 40-200, 40-180, 40-160, 40-140, 40-120 mg, 45-100 mg, 50-80 mg o 55-70 mg del anticuerpo. En una forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 10 mg del anticuerpo. En otra forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 20 mg del anticuerpo.

Dentro del alcance de esta invención también se contemplan los rangos intermedios de los rangos mencionados con anterioridad, por ejemplo, 132-138 ó 55-65. Por ejemplo, han de quedar incluidos los rangos de valores donde se use una combinación de cualquiera de los valores mencionados con anterioridad como límites superiores y/o inferiores. Dentro del alcance de esta invención también se contemplan las cantidades y las concentraciones intermedias de las cantidades y las concentraciones que se mencionaron con anterioridad para el anticuerpo anti-NGF (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 134,1, 134,2, 134,3, 134,4, 134,5, 134,6, 134,7, 134,8, 134,9, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 o aproximadamente 150 mg del anticuerpo).

Los amortiguadores que se usan en las composiciones farmacéuticas de la invención son aquellos que son apropiados para mantener el pH de la composición en el rango de entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 8,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,5 o entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,0. Preferiblemente, el amortiguador mantiene el pH de la composición farmacéutica de la invención en el rango de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0, entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0, entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,0, entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 6,5, entre aproximadamente 5,75 y aproximadamente 6,25 o entre aproximadamente 5,25 y aproximadamente 5,75. En una forma de realización, el pH de las composiciones de la invención es de aproximadamente 6,0. En una forma de realización, el pH de las composiciones de la invención es de aproximadamente 5,5. En una forma de realización, el pH de las composiciones de la invención es de aproximadamente 5,0. Dentro del alcance de esta invención también se contemplan los rangos y los valores intermedios de los rangos mencionados con anterioridad para el pH (por ejemplo, un pH de 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3 ó 6,4). Dentro del alcance de esta invención también se contemplan los rangos de valores donde se usa una combinación de cualquiera de los valores mencionados con anterioridad como límites superiores y/o inferiores.

Los ejemplos de amortiguadores que permiten controlar el pH dentro del rango de entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,0 incluyen los amortiguadores de fosfato, acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (por ejemplo, succinato de sodio), arginina, gluconato, glutamato, histidina, citrato y otros ácidos orgánicos.

En una forma de realización, el amortiguador es la histidina. En determinadas formas de realización de la invención, la concentración de la histidina en la composición es de aproximadamente 1-100 mM, aproximadamente 1-30 mM, aproximadamente 5-30 mM, aproximadamente 10-30 mM, aproximadamente 30-60 mM, aproximadamente 30-40 mM, aproximadamente 10-50 mM, aproximadamente 15-60 mM, aproximadamente 15-45 mM, aproximadamente 15-30 mM, aproximadamente 15-25 o aproximadamente 15-20 mM. En una forma de realización, la concentración de la histidina en la composición es de aproximadamente 20 mM. En otra forma de realización, la concentración de la histidina en la composición es de aproximadamente 15 mM. En otra forma de realización, la concentración de la histidina en la composición es de aproximadamente 30 mM. Dentro del alcance de esta invención también se contemplan las concentraciones y los rangos intermedios de las concentraciones mencionadas con anterioridad para la histidina (por ejemplo, histidina aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o aproximadamente 100 mM). Han de quedar incluidos los rangos de concentraciones donde se use una combinación de cualquiera de los valores mencionados con anterioridad como límites superiores y/o inferiores.

En otras formas de realización de la invención, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 1-10 mg de histidina o aproximadamente 2-5 mg de histidina. En una forma de realización, las composiciones comprenden aproximadamente 6 mg, por ejemplo, aproximadamente 5,7 mg de histidina.

En una forma de realización, las composiciones comprenden aproximadamente 5 mg, por ejemplo, aproximadamente 4,7 mg de histidina. En una forma de realización, las composiciones comprenden aproximadamente 2-3 mg de histidina. Dentro del alcance de esta invención también se contemplan las cantidades y los rangos intermedios de las cantidades mencionadas con anterioridad para la histidina (por ejemplo, aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,2, 2,3, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o aproximadamente 10 mg de histidina). Han de quedar incluidos los rangos de cantidades donde se use una combinación de cualquiera de los valores mencionados con anterioridad como límites superiores y/o inferiores.

También puede agregarse un detergente o un agente tensioactivo como excipiente a las composiciones de anticuerpos de la invención. Los ejemplos de detergentes incluyen los detergentes no iónicos, tales como los polisorbatos (por ejemplo, los polisorbatos 20, 80, etcétera) o los poloxámeros (por ejemplo, el poloxámero 188). La cantidad de detergente agregada es tal que reduce la agregación del anticuerpo formulado, minimiza la formación de particulados en la composición y/o reduce la absorción. Los agentes tensioactivos apropiados pueden incluir, por ejemplo, los polisorbatos, los éteres alquílicos de polioxietileno, tales como Brij 35™, o los poloxámeros, tales como Tween 20, Tween 80 o el poloxámero 188. Los detergentes preferidos son los éteres alquílicos de polioxietileno, por ejemplo, Brij 35™, Cremophor A25, Sympatens ALM/230; los polisorbatos/Tween, por ejemplo, el polisorbato 20, el polisorbato 80, Mirj y los poloxámeros, por ejemplo, el poloxámero 188, el poloxámero 407 y los Tween, por ejemplo, Tween 20 y Tween 80.

En una forma de realización preferida de la invención, la composición incluye un agente tensioactivo que es un polisorbato. En otra forma de realización preferida de la invención, la composición contiene el detergente polisorbato 80. En una forma de realización, la composición contiene entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 2,0 mg/ml, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1 mg/ml, entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 2,0 mg/ml, entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 1,0 mg/ml,

entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,5 mg/ml o entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 0,1 mg/ml de polisorbato 80. En una forma de realización, la composición comprende aproximadamente 1 mg/ml de polisorbato 80. En otra forma de realización, la composición comprende aproximadamente 0,1 mg/ml de polisorbato 80. En aun otra forma de realización, la composición comprende aproximadamente 0,05 mg/ml de polisorbato 80. En una forma de realización, la composición comprende entre aproximadamente 0,001% y aproximadamente 0,1%, entre aproximadamente 0,005% y aproximadamente 0,08%, entre aproximadamente 0,007% y aproximadamente 0,06%, entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,04%, entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,03% o entre aproximadamente 0,01% y 0,02% de polisorbato 80. En una forma de realización, la composición comprende aproximadamente 0,01% de polisorbato 80. En una forma de realización, la composición comprende aproximadamente 0,02% de polisorbato 80. Sin embargo, en otras formas de realización de la invención, las composiciones están esencialmente libres de agentes tensioactivos o no contienen agentes tensioactivos, tales como Tween o un polisorbato.

En determinadas formas de realización de la invención, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, pueden comprender entre aproximadamente 0,01 y 0,5 mg, por ejemplo, aproximadamente 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45 o aproximadamente 0,5 mg de un agente tensioactivo. En una forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 0,20 mg de un agente tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80. En una forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 0,10 mg de un agente tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80. Dentro del alcance de esta invención también se contemplan las cantidades y los rangos intermedios de las concentraciones y las cantidades mencionadas con anterioridad para los agentes tensioactivos, por ejemplo, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6,

1,7, 1,8, 1,9 ó 2,0 mg/ml de un agente tensioactivo. Además, han de quedar incluidos los rangos de valores donde se use una combinación de cualquiera de los valores mencionados con anterioridad como límites superiores y/o inferiores, por ejemplo, entre 0,04 y 1,8 mg/ml de un agente tensioactivo.

Las composiciones de la invención también pueden comprender un poliol. Los polioles útiles en las composiciones de la invención incluyen, sin limitaciones, uno o más de los siguientes: trehalosa, fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa, glucosa, sorbosa, melezitosa, rafinosa, manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol, glicerol, L-gluconato y las sales metálicas de éstos.

En una forma de realización, el poliol se selecciona del grupo que consiste en el sorbitol, el glicerol, la trehalosa y el manitol, o combinaciones de éstos. En una forma de realización, el poliol no es manitol. En determinadas formas de realización, la concentración del poliol en las composiciones de la invención es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg/ml, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 90 mg/ml, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 80 mg/ml, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 70 mg/ml, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 mg/ml o entre aproximadamente 50 y aproximadamente 60 mg/ml. En otras formas de realización, las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden un poliol en una concentración de aproximadamente 10-100 mg, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 90 mg/ml, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 80 mg/ml, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 70 mg/ml, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 mg/ml o entre aproximadamente 50 y aproximadamente 60 mg/ml. En otras formas de realización, las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones apropiadas para la liofilización, comprenden aproximadamente 1-50 mg/ml, aproximadamente 10-30 mg/ml o aproximadamente 20-25 mg/ml de un poliol.

En aun otras formas de realización, las composiciones de la invención, por ejemplo, las

composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 10-120, aproximadamente, aproximadamente 20-120, aproximadamente 30-120, aproximadamente 40-120, aproximadamente 50-120, aproximadamente 60-120, aproximadamente 10-110, aproximadamente 10-100, aproximadamente 10-90, aproximadamente 10-80 o aproximadamente 10-70 mg de un poliol o de una combinación de polioles. Dentro del alcance de esta invención también se contemplan las concentraciones y los rangos intermedios de las concentraciones mencionadas con anterioridad para los polioles (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o aproximadamente 100 mg/ml de un poliol). Han de quedar incluidos los rangos de concentraciones de polioles donde se use una combinación de cualquiera de los valores mencionados con anterioridad como límites superiores y/o inferiores, por ejemplo, 35-70 mg/ml de un poliol.

En una forma de realización, un poliol apropiado que ha de usarse en las composiciones de la invención es un alcohol de azúcar, por ejemplo, sorbitol. Las composiciones de la invención pueden comprender aproximadamente 20-60 mg/ml, aproximadamente 30-60 mg/ml, aproximadamente 20-50 mg/ml o aproximadamente 35-45 mg/ml de sorbitol. En una forma de realización, las composiciones comprenden aproximadamente 40 mg/ml de sorbitol.

En otra forma de realización, un poliol apropiado que ha de usarse en las composiciones de la invención es el manitol. Las composiciones de la invención pueden comprender aproximadamente 1-50 mg/ml, aproximadamente 10-40 mg/ml, aproximadamente 20-30 mg/ml o aproximadamente 20-25 mg/ml de manitol. En una forma de realización, las composiciones comprenden aproximadamente 20 mg/ml de manitol. En una forma de realización, las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones

apropiadas para la liofilización, comprenden aproximadamente 1-50 mg/ml, aproximadamente 10-30 mg/ml o aproximadamente 20-25 mg/ml de manitol, y preferiblemente comprenden 20 mg/ml de manitol. En aun otras formas de realización, las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 40-60 mg, aproximadamente 45-55 mg o aproximadamente 48-52 mg de manitol. En una forma de realización, las composiciones comprenden aproximadamente 50 mg, por ejemplo, aproximadamente 49,5 mg de manitol.

En otra forma de realización, un poliol apropiado que ha de usarse en las composiciones de la invención es el glicerol. Las composiciones de la invención pueden comprender aproximadamente 1-50 mg/ml, aproximadamente 10-40 mg/ml, aproximadamente 20-30 mg/ml, aproximadamente 20-25 mg/ml o aproximadamente 20 mg/ml de glicerol.

Pueden agregarse uno o más azúcares a las composiciones de la invención. Los ejemplos no limitativos de azúcares que son útiles en las composiciones de la invención incluyen la maltosa, la lactosa, la celobiosa, la gentiobiosa, la melibiosa, la turanosa, la fructosa, la levulosa, la glucosa, la dextrosa, la lactosa, la sacarosa, la trehalosa (que también se conoce como micosa o tremalosa), la rafinosa, la melezitosa, la estaquiosa y la verbascosa. En determinadas formas de realización, la concentración del azúcar es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 120 mg/ml, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg/ml, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 90 mg/ml, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 80 mg/ml, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 70 mg/ml, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60 mg/ml o entre aproximadamente 50 y aproximadamente 60 mg/ml. En otras formas de realización, las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 10-120, aproximadamente 20-120, aproximadamente 30-120, aproximadamente 40-120, aproximadamente 50-120, aproximadamente 60-120, aproximadamente 10-110, aproximadamente 10-100, aproximadamente 10-90, aproximadamente 10-80 o aproximadamente 10-70 mg de un azúcar.

En determinadas formas de realización, el azúcar es la sacarosa y está presente en las composiciones de la invención en una cantidad de aproximadamente 10-100 mg/ml, aproximadamente 10-90 mg/ml, aproximadamente 10-80 mg/ml, aproximadamente 10-70 mg/ml, aproximadamente 20-90 mg/ml, aproximadamente 20-80 mg/ml, aproximadamente 20-70 mg/ml, aproximadamente 30-70 mg/ml o aproximadamente 25-65 mg/ml. En una forma de realización, las composiciones comprenden aproximadamente 70 mg/ml de sacarosa. En una forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones apropiadas para la liofilización, comprenden aproximadamente 5 mg/ml de sacarosa. En una forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones apropiadas para la liofilización, comprenden aproximadamente 45 mg/ml de sacarosa. En otra forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones apropiadas para la liofilización, comprenden aproximadamente 46 mg/ml de sacarosa.

En aun otras formas de realización, las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 1-100, aproximadamente 1-70, aproximadamente 1-50, aproximadamente 10-120 mg, aproximadamente 10-100 mg, aproximadamente 10-50 mg, aproximadamente 10-20 mg o aproximadamente 12 mg, por ejemplo, aproximadamente 12,25 mg de sacarosa. En una forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 50-120 mg, aproximadamente 75-120 mg o aproximadamente 100-120 mg de sacarosa, por ejemplo, aproximadamente 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 ó 120 mg de sacarosa. En una forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 113 mg de sacarosa. En otra forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 70 mg de sacarosa. En otra forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 20 mg de sacarosa. En otra forma de realización, las

composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 10 mg de sacarosa. En otra forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 5 mg de sacarosa.

En otra forma de realización, el azúcar es la trehalosa. La trehalosa puede estar presente en las composiciones en una cantidad de aproximadamente 10-100 mg/ml, aproximadamente 10-90 mg/ml, aproximadamente 10-80 mg/ml, aproximadamente 10-70 mg/ml, aproximadamente 20-90 mg/ml, aproximadamente 20-80 mg/ml, aproximadamente 20-70 mg/ml, aproximadamente 30-70 mg/ml, aproximadamente 25-65 mg/ml o aproximadamente 35-55 mg/ml. En una forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones apropiadas para la liofilización, comprenden aproximadamente 40-50 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 45 mg/ml de trehalosa.

Dentro del alcance de esta invención también se contemplan las concentraciones y los rangos intermedios de las concentraciones mencionadas con anterioridad para los azúcares (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 o aproximadamente 120 mg/ml de azúcares). Han de quedar incluidos los rangos de concentraciones de azúcares donde se use una combinación de cualquiera de los valores mencionados con anterioridad como límites superiores y/o inferiores, por ejemplo, 35-70 mg/ml de azúcares.

En otras formas de realización, podrá incluirse cualquier combinación de uno o más de los azúcares precedentes y uno o más de los polioles precedentes en una composición de la invención. Por ejemplo, una composición de la invención, por ejemplo, una composición apropiada para la liofilización, pueden comprender un poliol, por ejemplo, manitol, y un

azúcar, por ejemplo, sacarosa. En determinadas formas de realización, la proporción molar entre el anticuerpo anti-NGF, o el fragmento de unión al antígeno de éste, y el poliol (por ejemplo, el manitol), el azúcar (por ejemplo, la sacarosa) o las combinaciones de éstos (por ejemplo, manitol y sacarosa) es mayor que aproximadamente 1:1200, preferiblemente mayor que aproximadamente 1:1400, más preferiblemente es de aproximadamente entre 1:1400 y 1:1500, o mayor que aproximadamente 1:1500.

En determinadas formas de realización de la invención, las composiciones también comprenden un aminoácido, por ejemplo, metionina. En una forma de realización, las composiciones comprenden metionina aproximadamente 1-10 mM, aproximadamente 2-10 mM, aproximadamente 2-9 mM, aproximadamente 2-8 mM, aproximadamente 2-7 mM, aproximadamente 2-6 mM, aproximadamente 2-5 mM, aproximadamente 3-8 mM, aproximadamente 3-7 mM, aproximadamente 3-6 mM o aproximadamente 3-5 mM. En una forma de realización, las composiciones comprenden metionina aproximadamente 4 mM. En otra forma de realización, las composiciones comprenden metionina aproximadamente 5 mM. En una forma de realización, las composiciones que comprenden metionina también comprenden un poliol, por ejemplo, manitol, y/o un azúcar, por ejemplo, sacarosa. En una forma de realización, las composiciones comprenden metionina, manitol y sacarosa. En una forma de realización, las composiciones no comprenden un aminoácido, por ejemplo, metionina.

En determinadas formas de realización de la invención, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, pueden comprender aproximadamente 0,1-10 mg, 0,5-9 mg, 1,0-8 mg, 1-6 mg, 1-5 mg, 1-4 mg, 1-3 mg o 1-2 mg, por ejemplo, aproximadamente 1,5, 1,6, 1,7, 1,75, 1,8, 1,81, 1,82, 1,83, 1,84, 1,85, 1,9 ó 2,0 mg de metionina. En una forma de realización, las composiciones, por ejemplo, las composiciones liofilizadas, comprenden aproximadamente 1,8 mg, por ejemplo, 1,83 mg de metionina. Dentro del alcance de esta invención también se contemplan los rangos y las cantidades intermedias de las concentraciones y las cantidades mencionadas con anterioridad para la metionina,

por ejemplo, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 ó 10 mM. Además, han de quedar incluidos los rangos de valores donde se use una combinación de cualquiera de los valores mencionados con anterioridad como límites superiores y/o inferiores, por ejemplo, 3,5-9 mM.

En una forma de realización, la composición está esencialmente libre de preservantes, tales como el alcohol bencílico, el fenol, el m-cresol, el clorobutanol y el cloruro de benzetonio. En otra forma de realización, en la composición puede incluirse un preservante. En la composición podrán incluirse uno o más vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables adicionales, tales como los que se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, editado por Osol, A. (1980), con la condición de que no afecten de manera adversa las características deseadas de la composición. Los vehículos, los excipientes o los estabilizadores apropiados no son tóxicos para los receptores, en las dosis y las concentraciones que se emplean, e incluyen agentes amortiguadores adicionales, cosolventes, antioxidantes, que incluyen el ácido ascórbico y la metionina, agentes quelantes, tales como el EDTA, complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteínas), polímeros biodegradables, tales como los poliésteres, y/o contraiones formadores de sales, tales como el sodio.

En formas de realización particulares, las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan como un líquido que comprende (a) aproximadamente 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 ó 20-75 mg/ml de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) histidina aproximadamente 5-50, 5-30, 5-20 ó 10-20 mM, y (c) aproximadamente 0,01-0,02% de polisorbato 80, o bien como un líquido que consiste esencialmente en dichos componentes o que consiste en ellos, donde el pH de la composición es de aproximadamente 5,0-6,0 o de aproximadamente 5,5. En determinadas formas de realización preferidas, el anticuerpo anti-NGF es PG100 o un fragmento de unión al antígeno de PG110. En determinadas formas de realización preferidas, la concentración de histidina es de aproximadamente 10 ó 15 mM.

En formas de realización particulares, las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan como un líquido que comprende (a) aproximadamente 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 ó 20-75 mg/ml de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) histidina aproximadamente 5-50, 5-30, 5-20 ó 10-20 mM, (c) aproximadamente 0,01-0,2% de polisorbato 80 y (d) aproximadamente 20-80, 30-80 ó 40-80 mg de un poliol, o bien como un líquido que consiste esencialmente en dichos componentes o que consiste en ellos, donde el pH de la composición es de aproximadamente 5,0-6,0 de aproximadamente 5,5. En determinadas formas de realización preferidas, el anticuerpo anti-NGF es PG100 o un fragmento de unión al antígeno de PG110. En determinadas formas de realización preferidas, la concentración de histidina es de aproximadamente 10 ó 15 mM. En determinadas formas de realización preferidas, el poliol es manitol o sorbitol. En otras formas de realización preferidas, la concentración del poliol es de 20, 30 ó 40 mg/ml. En otras formas de realización preferidas, la composición también comprende un azúcar, preferiblemente sacarosa o trehalosa, en una cantidad de aproximadamente 10-20, 20-50 ó 30-80 mg/ml.

En formas de realización particulares, las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan como un líquido que comprende (a) aproximadamente 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 ó 20-75 mg/ml de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) histidina aproximadamente 5-50, 5-30, 5-20 ó 10-20 mM, (c) aproximadamente 0,01-0,2% de polisorbato 80 y (d) aproximadamente 20-80, 30-80 ó 40-80 mg/ml de un azúcar, o bien como un líquido que consiste esencialmente en dichos componentes o que consiste en ellos, donde el pH de la composición es de aproximadamente 5,0-6,0 o de aproximadamente 5,5. En determinadas formas de realización preferidas, el anticuerpo anti-NGF es PG100 o un fragmento de unión al antígeno de PG110. En determinadas formas de realización preferidas, la concentración de histidina es de aproximadamente 10 ó 15 mM. En determinadas formas de realización preferidas, el azúcar es sacarosa o trehalosa. En otras formas de realización preferidas, la

concentración del azúcar es de 70 ó 80 mg/ml. En formas de realización particulares, las composiciones farmacéuticas de la invención se proveen en una forma liofilizada apropiada para reconstituir una forma líquida. Por cada ml del líquido reconstituido, las composiciones liofilizadas comprenden (a) aproximadamente 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 ó 20-75 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) aproximadamente 1-20, 1-10, 1-5 ó 2-4 mg de histidina y (c) aproximadamente entre 0,1 y 0,2 mg de polisorbato 80, o bien consisten esencialmente en dichos elementos o consisten en ellos. En determinadas formas de realización preferidas, las composiciones contienen aproximadamente 10, 20 ó 50 mg de PG100 o de un fragmento de unión al antígeno de PG110. En determinadas formas de realización preferidas, la composición contiene aproximadamente 2-3 mg de histidina. En determinadas formas de realización preferidas, la composición contiene 0,1 mg de polisorbato 80.

En formas de realización particulares, las composiciones farmacéuticas de la invención se proveen en una forma liofilizada apropiada para reconstituir una forma líquida. Por cada ml del líquido reconstituido, las composiciones liofilizadas comprenden (a) aproximadamente 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 ó 20-75 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) aproximadamente 1-20, 1-10, 1-5 ó 2-4 mg de histidina, (c) aproximadamente entre 0,1 y 0,2 mg de polisorbato 80 y (d) aproximadamente 20-80, 30-80 ó 40-80 mg de un poliol, o bien consisten esencialmente en dichos elementos o consisten en ellos. En determinadas formas de realización preferidas, las composiciones contienen aproximadamente 10, 20 ó 50 mg de PG100 o de un fragmento de unión al antígeno de PG110. En determinadas formas de realización preferidas, la composición contiene aproximadamente 2-3 mg de histidina. En determinadas formas de realización preferidas la composición contiene 0,1 mg de polisorbato 80. En determinadas formas de realización preferidas, la composición contiene 10, 20, 30 ó 40 mg de manitol o sorbitol. En determinadas formas de realización preferidas, la composición también contiene aproximadamente 10-40 mg de un azúcar,

preferiblemente sacarosa o trehalosa.

En formas de realización particulares, las composiciones farmacéuticas de la invención se proveen en una forma liofilizada apropiada para reconstituir una forma líquida. Por cada ml del líquido reconstituido, las composiciones liofilizadas comprenden (a) aproximadamente 1-10, 5-15, 10-20, 10-30, 20-50 ó 20-75 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste, (b) aproximadamente 1-20, 1-10, 1-5 ó 2-4 mg de histidina, (c) aproximadamente entre 0,1 y 0,2 mg de polisorbato 80 y (d) 20-80, 30-80 ó 40-80 mg/ml de un azúcar, o bien consisten esencialmente en dichos elementos o consisten en ellos. En determinadas formas de realización preferidas, las composiciones contienen aproximadamente 10, 20 ó 50 mg de PG100de un fragmento de unión al antígeno de PG110. En determinadas formas de realización preferidas, la composición contiene aproximadamente 2-3 mg de histidina. En determinadas formas de realización preferidas la composición contiene 0,1 mg de polisorbato 80. En determinadas formas de realización preferidas, la composición contiene aproximadamente 20, 40, 70 ó 80 mg de un azúcar, preferiblemente sacarosa o trehalosa.

Las composiciones de la invención también podrán combinarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales, según sea necesario para la indicación particular que se desee tratar, preferiblemente con agentes que presenten actividades complementarias que no afecten de manera adversa al anticuerpo de la composición. Apropiadamente, estos agentes terapéuticos estarán presentes combinados, en cantidades que sean eficaces para el propósito deseado.

Las composiciones que han de usarse para la administración in vivo deben ser estériles. La esterilidad se obtiene fácilmente por medio de una filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la preparación de la composición.

Como se describió con anterioridad, las composiciones de la invención, por ejemplo, las composiciones líquidas apropiadas para la liofilización y las composiciones liofilizadas, tienen una estabilidad y propiedades de almacenamiento ventajosas. La estabilidad de la

composición líquida no depende de la forma de almacenamiento e incluye, sin limitaciones, las composiciones que son congeladas, liofilizadas, secadas por aspersión o las composiciones donde el ingrediente activo está suspendido. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada, durante un período de tiempo seleccionado. En un aspecto de la invención, la proteína en las composiciones líquidas es estable en forma líquida durante al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 4 meses, al menos aproximadamente 5 meses, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses o más. Dentro del alcance de esta invención también se contemplan los rangos intermedios de los períodos de tiempo mencionados con anterioridad, por ejemplo, aproximadamente 9 meses, y semejantes. Además, han de quedar incluidos los rangos de valores donde se use una combinación de cualquiera de los valores mencionados con anterioridad como límites superiores y/o inferiores.

Preferiblemente, la composición es estable a temperatura ambiente, o bien a aproximadamente 30°C, o a 40°C durante al menos aproximadamente 1 mes, y/o es estable a aproximadamente 2-8°C durante al menos aproximadamente 1 año, o más preferiblemente, es estable a aproximadamente 2-8°C durante al menos aproximadamente 2 años. Además, la composición preferiblemente es estable después de congelarla (por ejemplo, a -80°C) y descongelarla, lo que se conocerá de aquí en adelante como un “ciclo de congelación/descongelación”. En una forma de realización, la composición es estable después de uno, dos, tres o más ciclos de congelación/descongelación.

La estabilidad de una proteína en una composición líquida también puede definirse como el porcentaje de un monómero, un agregado o un fragmento de una proteína en la composición, o de combinaciones de éstos, que puede medirse, por ejemplo, por medio de la dispersión de la luz UV o con una cromatografía de exclusión por tamaño. En un aspecto de la invención, una composición líquida estable es una composición que

presenta menos de aproximadamente 10%, preferiblemente menos de aproximadamente 5% y más preferiblemente menos de aproximadamente 2% de las proteínas presentes como agregados.

En una forma de realización, la estabilidad física de una composición líquida se establece determinando la turbidez de la composición después de un ensayo de estrés con agitación, por ejemplo, un ensayo de estrés con agitación durante 24 horas o 48 horas. Por ejemplo, el ensayo de estrés con agitación puede llevarse a cabo colocando un volumen apropiado de una composición líquida en un frasco con un agitador magnético (por ejemplo, multipoint HP, 550 rpm), tomando alícuotas en cualquier momento apropiado, por ejemplo, en T0-T48 (horas), y realizando ensayos apropiados con las alícuotas, según se lo desee. Como control, pueden usarse muestras de una composición bajo las mismas condiciones, pero sin agitación. Las mediciones de la turbidez pueden efectuarse usando el sistema de laboratorio para medir la turbidez de Hach (Alemania), y se informan en unidades nefelométricas (NTU).

Las composiciones de la invención también presentan propiedades de tolerabilidad ventajosas. La tolerabilidad se evalúa sobre la base de la evaluación del dolor percibido por un sujeto en el sitio de la inyección, usando la Escala Análoga Visual del Dolor (VAS). La (VAS) es un instrumento de medición con el que se mide el dolor en un rango continuo de valores, por ejemplo, entre cero y una cantidad extrema de dolor. En términos operativos, la VAS es una línea horizontal de aproximadamente 100 mm de longitud con indicadores en forma de números y/o palabras, por ejemplo, 0 ó 10, o bien “sin dolor” o “dolor muy intenso”, opcionalmente con indicadores adicionales en forma de números y/o palabras entre los extremos, por ejemplo, leve, moderado y severo, o 1 a 9 (véase, por ejemplo, Lee et al. (2000) Acad. Emerg. Med. 7:550).

Otros indicadores de la tolerabilidad que pueden medirse incluyen, por ejemplo, la escala de Draize (hemorragia, petequia, eritema, edema, prurito) y el edema.

III. Anticuerpos anti-NGF

Los anticuerpos anti-NGF que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención se describen, por ejemplo, en la Publicación PCT N° WO/2010/128398, la Publicación PCT N° WO 2001/78698, la Publicación PCT N° WO 2001/64247, la Publicación PCT N° WO 2002/096458, la Publicación PCT N° WO 2004/032870, la Publicación PCT N° WO 2004/058184, la Publicación PCT N° WO 2005/061540, la Publicación PCT N° WO 2005/019266, la Publicación PCT N° WO 2006/077441, la Publicación PCT N° WO 2006/131951, la Publicación PCT N° WO 2006/110883, la Publicación PCT N° WO 2009/023540, la Patente de los EEUU N° 7449616, la Publicación de los EEUU N° US 20050074821, la Publicación de los EEUU N° US 20080033157, la Publicación de los EEUU N° US 20080182978 o la Publicación de los EEUU N° US 20090041717, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia, particularmente los contenidos relacionados con los anticuerpos anti-NGF.

En una forma de realización, los anticuerpos anti-NGF que han de usarse en las composiciones farmacéuticas se caracterizan porque presentan una estabilidad in vivo mejorada, la cual se ve reflejada en la vida media de eliminación terminal prolongada que se observa in vivo. Aunque no se desea limitar la invención a un mecanismo, se cree que la vida media de eliminación terminal extendida del anticuerpo es el resultado de una velocidad de eliminación reducida del anticuerpo y no de un incremento en el volumen de distribución del anticuerpo. Preferiblemente, los anticuerpos que han de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una región constante de la IgG4 humana que comprende una mutación. Una mutación preferida es una mutación en la región de la bisagra. Preferiblemente, la mutación en la región de la bisagra comprende una mutación de la serina en la posición del aminoácido 108 de SEQ ID N° 9 (donde se ilustra la secuencia de aminoácidos de la región constante de la IgG4 humana salvaje). Más preferiblemente, la mutación en la región de la bisagra comprende la mutación de la serina en la posición del aminoácido 108 de SEQ ID N° 9 en prolina. En una forma de

realización preferida, la región constante de la IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 10.

En una forma de realización, un anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención presenta una vida media de eliminación terminal inesperadamente larga, tal como una vida media de eliminación terminal en un mono Cynomolgus de al menos 15 días, y típicamente en el rango de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 22 días (o en un rango de 15-22 días), o en un rango de entre aproximadamente 15 días y aproximadamente 28 días (o en un rango de 15-28 días) o en un rango de entre aproximadamente 21 días y aproximadamente 28 días (o en un rango de 21-28 días). Este anticuerpo anti-NGF estabilizado también presenta una vida media de eliminación terminal en ratas de al menos 8 días, típicamente en el rango de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 9 días (o en un rango de 8-9 días).

En una forma de realización, un anticuerpo anti-NGF preferido que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención, PG110, presenta una vida media de eliminación terminal promedio en monos Cynomolgus de al menos 15 días, y típicamente más larga. Por ejemplo, en un estudio en monos Cynomolgus se observó una vida media de eliminación terminal promedio en un rango de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 22 días. En otro estudio en monos Cynomolgus se observó una vida media de eliminación terminal promedio en un rango de entre aproximadamente 21 y aproximadamente 28 días. Además, PG110 presenta una vida media de eliminación terminal promedio en ratas de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 9 días. Más aun, como en la técnica se sabe que la vida media de eliminación terminal de la IgG en los seres humanos es aproximadamente el doble que en los monos, se predice que los anticuerpos anti-NGF de la invención, tales como PG110, tendrán una media de eliminación terminal en los seres humanos de al menos 10-30 días, o de al menos 10 días, o de al menos 15 días, o de al menos 20 días, o de al menos 25 días, o más

preferiblemente de al menos 30 días o al menos 40 días, o en un rango de entre aproximadamente 10 días y aproximadamente 40 días (o en un rango de 10-40 días) o en un rango de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 días (o en un rango de 15-30 días). Adicionalmente o como alternativa, el anticuerpo puede presentar una vida media farmacológica en los seres humanos de al menos 30 días, al menos 35 días o al menos 40 días, en un rango de al menos entre cuatro y seis semanas (o en un rango de entre cuatro y seis semanas), en un rango de al menos entre cuatro y siete semanas (o en un rango de entre cuatro y siete semanas) o en un rango de al menos entre cuatro y ocho semanas (o en un rango de entre cuatro y ocho semanas). Como se describe con mayor detalle en el ejemplo 8, se ha demostrado que un anticuerpo anti-NGF de la invención de la invención presenta una vida media farmacológica en los seres humanos en los rangos que se mencionaron con anterioridad.

La vida media de eliminación terminal para PG110 en monos *Cynomolgus* es considerablemente más larga que la vida media que se ha descrito para otros anticuerpos del tipo de la IgG4 en monos *Cynomolgus*. Por ejemplo, se ha informado una vida media de aproximadamente 40-90 horas (aproximadamente 1,6-3,8 días) en monos *Cynomolgus* para CDP571, un anticuerpo anti-TNF del tipo de la IgG4 (véase Stephens, S. et al. (1995) *Immunol.* 85:668-674). De manera similar, se ha informado una vida media de aproximadamente 3 días en monos *Cynomolgus* para natalizumab, un anticuerpo anti-integrina del tipo de la IgG4 (véase Refusal CHMP Assessment Report for Natalizumab, European Medicines Agency, Londres, 15 de Noviembre de 2007, Doc. Ref. EMEA/CHMP/8203/2008).

En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden anticuerpos anti-NGF donde la mutación en la región de la bisagra preferida es una mutación de serina en prolina en la posición 108 en SEQ ID N° 9. Esta mutación ha sido descrita en los antecedentes técnicos (véase Angal, S. et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-108), y se ha informado que anula la heterogeneidad de las moléculas

de IgG4, particularmente la formación de semi-anticuerpos que contienen una sola cadena pesada y una sola cadena liviana. Por consiguiente, en la invención también se incluye la sustitución del aminoácido en la posición 108 de SEQ ID N° 9 por un aminoácido distinto de la prolina, donde la sustitución tiene el mismo efecto que la mutación de Ser en Pro con relación a la eliminación de la heterogeneidad de la molécula de IgG4 (por ejemplo, la formación de semi-anticuerpos). La capacidad de una mutación en la posición 108 de eliminar la heterogeneidad de la molécula de IgG4 puede evaluarse como se describe en Angal et al. (1993), supra.

Adicionalmente, o como alternativa a la modificación en la posición 108 de SEQ ID N° 9, se han descrito otras mutaciones en la región de la bisagra de la IgG que mejoran la afinidad de la interacción FcRn-IgG, lo que resulta en una vida media extendida para la IgG modificada. Los ejemplos de estas modificaciones adicionales o alternativas incluyen mutaciones en una o más residuos de la región constante de la IgG que corresponden a Thr250, Met252, Ser254, Thr256, Thr307, Glu308, Met428, His433 y/o Asn434 (como se describe con mayor detalle 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).

Se han descrito otras mutaciones para estabilizar la región constante de la IgG4 además de las mutaciones en la región de la bisagra. Por ejemplo, en otras formas de realización, la mutación de la región constante de la IgG4 humana comprende la sustitución de la región CH3 de la IgG4 por la región CH3 de la IgG1, la sustitución de las regiones CH2 y CH3 de la IgG4 por las regiones CH2 y CH3 de la IgG1 o la sustitución de la arginina en la posición 409 de la región constante de la IgG4 (de acuerdo con la numeración de Kabat) por una lisina, como se describe con mayor detalle en la Publicación de Patente de los EEUU 20080063635. En aun otras formas de realización, la mutación de la región

constante de la IgG4 humana comprende la sustitución de Arg409, Phe405 o Lys370 (de acuerdo con la numeración de Kabat), tal como la sustitución de Arg409 por Lys, Ala, Thr, Met o Leu o la sustitución de Phe405 por Ala, Val, Gly o Leu, como se describe con mayor detalle en la Publicación PCT WO 2008/145142.

Una mutación deseada puede introducirse en el dominio de la región constante de la IgG4 humana usando técnicas de ADN recombinante convencionales, tales como la mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis mediada por PCR de un ácido nucleico que codifica la región constante de la IgG4 humana. Además, el ADN que codifica la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo puede introducirse en un vector de expresión que codifica una región constante mutada de la IgG4 humana, de modo que la región variable y la región constante queden unidas operativamente, para luego crear un vector que codifique una cadena pesada de inmunoglobulina completa donde la región constante sea una región constante mutada de la IgG4 humana. Después, el vector de expresión puede usarse para expresar la cadena pesada de inmunoglobulina completa usando métodos convencionales para la expresión de proteínas recombinantes. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF de la invención puede construirse como se describe con mayor detalle en el ejemplo 1.

La vida media de eliminación terminal de un anticuerpo puede determinarse usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, después de la administración del anticuerpo a un sujeto (por ejemplo, un mono *Cynomolgus*, una rata *Sprague-Dawley*), pueden tomarse muestras de sangre en diversos puntos de tiempo después de la administración y puede determinarse la concentración del anticuerpo en el suero proveniente de las muestras de sangre usando un procedimiento conocido en la técnica (tal como un ensayo ELISA), con el fin de determinar la concentración del anticuerpo. El cálculo de la vida media terminal del anticuerpo puede efectuarse usando métodos farmacocinéticos conocidos, por ejemplo, usando un sistema informático y un software diseñado para calcular los parámetros farmacocinéticos (un ejemplo no limitativo

incluye el sistema de análisis farmacocinético de SNBL USA, con el software WinNonlin).

En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención contienen un anticuerpo anti-NGF, o una porción de unión al antígeno de éste, que comprende las regiones variables de la cadena pesada y liviana del anticuerpo PG110. La región variable de la cadena pesada de PG110 se detalla en SEQ ID N° 1, y la región variable de la cadena liviana de PG110 se detalla en SEQ ID N° 2. Por consiguiente, en una forma de realización, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2. En aun otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2.

La secuencia de aminoácidos completa de la cadena pesada de PG110 (con las regiones variables y constantes) se detalla en SEQ ID N° 13. Esta cadena pesada podrá elaborarse a partir de una cadena pesada precursora que incluya una secuencia directriz o señal, tal como la secuencia de aminoácidos que se detalla en SEQ ID N° 12. La cadena pesada precursora de SEQ ID N° 12 está codificada por la secuencia de nucleótidos que se detalla en SEQ ID N° 11.

La secuencia de aminoácidos completa de la cadena liviana de PG110 (con las regiones variables y constantes) se detalla en SEQ ID N° 16. Esta cadena liviana puede elaborarse a partir de una cadena liviana precursora, la cual incluye una secuencia directriz o señal, tal como la secuencia de aminoácidos que se detalla en SEQ ID N° 15. La cadena liviana precursora de SEQ ID N° 15 está codificada por la secuencia de nucleótidos que se detalla en SEQ ID N° 14.

Por consiguiente, en otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF que ha de usarse

en las composiciones farmacéuticas de la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 13, donde el anticuerpo tiene una vida media en suero de mono Cynomolgus de al menos 15 días. En otra forma de realización, la vida media en suero de mono Cynomolgus puede hallarse en un rango de entre aproximadamente 15 días y aproximadamente 22 días (o en un rango de entre 15 y 22 días). En otras formas de realización, la vida media en suero de rata puede ser de al menos 8 días, o puede hallarse en un rango de entre aproximadamente 8 días y aproximadamente 9 días (o en un rango de entre 8 y 9 días). En aun otras formas de realización, la vida media en suero humano puede ser de al menos entre 10 y 30 días, o de al menos 10 días, o de al menos 15 días, o de al menos 20 días, o de al menos 25 días, o de al menos 30 días, o de al menos 40 días, o puede hallarse en un rango de entre aproximadamente 10 días y aproximadamente 40 días (o en un rango de entre 10 y 40 días), o en un rango de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 días (o en un rango de entre 15 y 30 días). Adicionalmente o como alternativa, el anticuerpo puede presentar una vida media farmacológica en los seres humanos de al menos 30 días, al menos 35 días o al menos 40 días, en un rango de al menos entre cuatro y seis semanas (o en un rango de entre cuatro y seis semanas), en un rango de al menos entre cuatro y siete semanas (o en un rango de entre cuatro y siete semanas) o en un rango de al menos entre cuatro y ocho semanas (o en un rango de entre cuatro y ocho semanas). Preferiblemente, la cadena pesada está codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 11. Preferiblemente, la cadena liviana del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16. Preferiblemente, la cadena liviana está codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 14.

En aun otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 13 y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16.

En aun otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención comprende una cadena pesada codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 11, y una cadena liviana codificada por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 14.

Debido a que la especificidad de unión de PG110 es provista por las regiones de determinación de la complementariedad (CDR) del dominio variable, en otra forma de realización, un anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención comprende las CDR de la cadena pesada de PG110, la cadena liviana de PG110 o ambas. Las CDR 1, 2 y 3 de la cadena pesada de PG110 se detallan en SEQ ID N° 3, 4 y 5, respectivamente. Las CDR 1, 2 y 3 de la cadena liviana de PG110 se detallan en SEQ ID N° 6, 7 y 8, respectivamente. Por consiguiente, en una forma de realización, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 3, 4 y 5, respectivamente. En otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de la cadena liviana que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 6, 7 y 8, respectivamente. En aun otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 3, 4 y 5, respectivamente, y comprende una región variable de la cadena liviana que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 6, 7 y 8, respectivamente.

En aun otra forma de realización, un anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención puede comprender regiones variables de las cadenas pesada y liviana que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las regiones variables de la cadena pesada y/o liviana de PG110, donde los anticuerpos retienen la estabilidad in vivo potenciada que presenta PG110. Por ejemplo, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-NGF puede comprender una

secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga, más preferiblemente al menos 95% homóloga, más preferiblemente al menos 97% homóloga e incluso más preferiblemente al menos 99% homóloga a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1. La región variable de la cadena liviana del anticuerpo anti-NGF puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga, más preferiblemente al menos 95% homóloga, más preferiblemente al menos 97% homóloga e incluso más preferiblemente al menos 99% homóloga a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2.

Como se usa en la presente, la homología porcentual entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente a la identidad porcentual entre las dos secuencias. La identidad porcentual entre dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % homología = cantidad de posiciones idénticas/cantidad total de posiciones x 100), teniendo en cuenta la cantidad de intervalos de residuos no coincidentes y la longitud de cada intervalo de residuos no coincidentes que debe ser introducido para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación entre las secuencias y la determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias puede efectuarse usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, la identidad porcentual entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)), que ha sido incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalidad de extensión de falta de coincidencia de 12 y una penalidad de falta de coincidencia de 4. Adicionalmente, la identidad porcentual entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)), que ha sido incorporado en el programa GAP en el conjunto de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, una ponderación de falta de coincidencia de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ó 4 y una ponderación de extensión de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

En aun otra forma de realización, un anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las

composiciones farmacéuticas de la invención puede comprender regiones variables de las cadenas pesada y liviana que comprenden las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y/o liviana de PG110, pero donde se han introducido una o más sustituciones conservativas, independientemente de lo cual el anticuerpo retiene la estabilidad in vivo potenciada que presenta PG110. Por ejemplo, la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-NGF puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1, excepto por 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con SEQ ID N° 1. La región variable de la cadena liviana del anticuerpo anti-NGF puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2, excepto por 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con SEQ ID N° 2.

Como se lo usa en la presente, el término “sustitución de aminoácidos conservativa” hace referencia a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión o estabilidad del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservativas incluyen sustituciones, las adiciones y las supresiones de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en un anticuerpo de esta invención con procedimientos convencionales conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas son aquellas donde el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen los aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, la lisina, la arginina, histidina), los aminoácidos con cadenas laterales ácidas (por ejemplo, el ácido aspártico, el ácido glutámico), los aminoácidos con cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, la glicina, la asparragina, la glutamina, la serina, la treonina, la tirosina, la cisteína, el triptofano), los aminoácidos con cadenas laterales no

polares (por ejemplo, la alanina, la valina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina, la metionina), los aminoácidos con cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, la treonina, la valina, la isoleucina) y los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, la tirosina, la fenilalanina, el triptofano, la histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos en las regiones variables de PG110 pueden reemplazarse por otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales, después de lo cual puede determinarse si el anticuerpo alterado retiene la función deseada usando los ensayos de la función que se describen en la presente.

En aun otra forma de realización, un anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención comprende regiones de unión al antígeno (es decir, regiones variables) que se unen a un epítopo en el NGF que es idéntico al que se une el anticuerpo PG110, o compite con PG110 por la unión al NGF. Por consiguiente, en una forma de realización, el anticuerpo anti-NGF de la invención compite por la unión al NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2.

Estos anticuerpos competitivos pueden identificarse sobre la base de su capacidad de competir con PG110 en ensayos convencionales de unión al NGF. Por ejemplo, pueden usarse los ensayos de ELISA convencionales en los que se inmoviliza una proteína recombinante del NGF (por ejemplo, NGF- β humana) en una placa, se marca uno de los anticuerpos con fluorescencia y se evalúa la capacidad de los anticuerpos no marcados de competir por la unión con el anticuerpo marcado. Adicionalmente o como alternativa, puede usarse el análisis BIAcore para evaluar la capacidad de competición de los anticuerpos. Con anterioridad (por ejemplo, en WO/2010/128398) se han descrito ensayos de unión apropiados que pueden usarse para evaluar la capacidad de un anticuerpo de competir por la unión al NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°

1 y región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2.

En aun otras formas de realización, un anticuerpo anti-NGF útil en las composiciones de la invención presenta una o más propiedades funcionales del anticuerpo PG110. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF de la invención puede presentar una o más de las siguientes propiedades funcionales:

- se une al NGF humano pero no se une al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) humano, a la neurotrofina 3 (NT-3) humana o a la neurotrofina 4 (NT-4) humana;
- se une al NGF humano o de rata con una KD de 100 pM o menos;
- inhibe la unión del NGF a TrkA o a p75NTR;
- inhibe la proliferación de las células TF-1 dependiente del NGF;
- inhibe la supervivencia del ganglio de la raíz dorsal del pollo dependiente del NGF;
- inhibe el desarrollo de las neuritas de las células PC12 dependiente del NGF.

Estas propiedades funcionales pueden evaluarse usando los ensayos in vitro que se conocen en la técnica y que se describen, por ejemplo, en WO/2010/128398. Con relación a la unión específica del anticuerpo al NGF humano, el término “no se une al factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) humano, a la neurotrofina 3 (NT-3) humana o a la neurotrofina 4 (NT-4) humana”, como se lo usa en la presente, denota que la magnitud de la unión que se observa entre el anticuerpo y BDNF, NT-3 o NT-4 en un ensayo de unión convencional (por ejemplo, un ELISA u otro ensayo in vitro apropiado, como se describe en los ejemplos) es comparable con los niveles de unión de fondo (por ejemplo, para un anticuerpo control), por ejemplo, no más de dos veces sobre los niveles de fondo, o bien una unión a BDNF, NT-3 o NT-4 que es 5% de la unión al NGF humano (donde el nivel de unión al NGF humano se establece como 100%).

En aun otra forma de realización, el anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso (NGF) que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención comprende una región constante de la IgG4 humana, donde la región constante de la IgG4 humana

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 10 (o donde la región constante de la IgG4 humana comprende una mutación de serina en la posición de aminoácido 108 de SEQ ID N° 9, preferiblemente una mutación de serina en prolina en la posición 108), y donde el anticuerpo se une al NGF humano o murino con una KD de 100 pM o menos (o como alternativa, con una KD de 300 pM o menos, 200 mP o menos, 150 pM o menos, 75 pM o menos ó 50 pM o menos), inhibe la unión del NGF a TrkA o p75NTR con una IC50 de 250 pM o menos (o como alternativa, con una IC50 de 500 pM o menos, 400 pM o menos, 300 pM o menos ó 200 pM o menos), e inhibe la proliferación dependiente del NGF de las células TF-1 con una IC50 de 50 ng/ml o menos (o como alternativa, con una IC50 de 150 ng/ml o menos, 100 ng/ml o menos, 75 ng/ml o menos ó 40 ng/ml o menos). Preferiblemente, el anticuerpo tiene una vida media de eliminación terminal en los seres humanos de al menos 10-30 días, o de al menos 10 días, o de al menos 15 días, o de al menos 20 días, o de al menos 25 días, o de al menos 30 días, o en un rango de entre aproximadamente 10 días y aproximadamente 40 días (o en un rango de entre 10 y 40 días) o en un rango de entre aproximadamente 15 días y aproximadamente 30 días (o en un rango de entre 15 y 30 días). Adicionalmente o como alternativa, el anticuerpo puede presentar una vida media de eliminación terminal promedio en un mono Cynomolgus de al menos 15 días, y típicamente en un rango de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 22 días (o en un rango de entre 1 y 22 días), o en un rango de entre aproximadamente 15 días y aproximadamente 28 días (o en un rango de entre 15 y 28 días), o en un rango de entre aproximadamente 21 días y aproximadamente 28 días (o en un rango de entre 21 y 28 días). Adicionalmente o como alternativa, el anticuerpo puede presentar una vida media de eliminación terminal en ratas de al menos 8 días, típicamente en un rango de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 9 días (o en un rango de entre 8 y 9 días). El anticuerpo también puede presentar una o más propiedades funcionales adicionales, tales como la unión al NGF humano, pero no al factor neurotrófico derivado del cerebro humano (BDNF), a la neurotrofina 3 humana (NT-3) o a

la neurotrofina 4 humana (NT-4), la inhibición de la supervivencia dependiente del NGF del ganglio de la raíz dorsal del pollo y/o la inhibición del desarrollo de las neuritas de las células PC12 dependiente del NGF. Preferiblemente, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de al menos entre aproximadamente una semana y aproximadamente doce semanas después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 3, 4 y 5, respectivamente, o el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 6, 7 y 8, respectivamente, o el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 3, 4 y 5, respectivamente, y una región variable de la cadena liviana que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 6, 7 y 8, respectivamente. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1, o el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2, o el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 y una región de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2, o el anticuerpo compite por la unión al NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2.

En aun otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención no presenta un efecto de rebote cuando se lo administra a un sujeto (por ejemplo, el anticuerpo se administra en una dosificación y con una frecuencia tal que se evita el efecto de rebote en el sujeto). El efecto de rebote,

donde un anticuerpo anti-NGF presenta una eficacia disminuida en un sujeto después de un período inicial de efectividad posterior a una administración única o repetida, ha sido descrito tanto en modelos animales como en estudios clínicos de otros anticuerpos anti-NGF. Por ejemplo, dicho efecto, que se conoce como “fenómeno de rebote”, se describió para un anticuerpo NGF murino en un modelo de daño por constricción crónica en rata (CCI) (Ro, L-S. et al. (1999) *Pain* 79:265-274). Adicionalmente, hay disponibles estudios clínicos del dolor con el anticuerpo anti-NGF tanezumab (que también se conoce como RN624, E3, CAS Registro N° 880266-57-9) donde se observó un período de efectos adversos aumentados, tales como la sensibilidad al tacto y la sensación de hormigueo, después de un período de analgesia inicial (véase la presentación de Hefti, Franz F., Rinat Neuroscience, LSUHSC, Shreveport, Luisiana, 26 de septiembre de 2006). Sin que se desee limitar la invención a un mecanismo, se cree que la vida media de eliminación terminal prolongada de los anticuerpos anti-NGF que se describen en la presente impide que presenten un efecto de rebote. De este modo, otras ventajas de los anticuerpos anti-NGF que se usan en las composiciones de la invención incluyen una actividad in vivo más consistente y prolongada, en comparación con otros anticuerpos anti-NGF de los antecedentes técnicos. Dada la vida media de eliminación terminal prolongada de los anticuerpos anti-NGF de la invención, pueden usarse dosis menores (en comparación con otros anticuerpos anti-NGF), y de ser necesario, también es posible usar el anticuerpo a intervalos más frecuentes, donde la dosificación y el cronograma de los regímenes de tratamiento pueden seleccionarse de manera tal de evitar un efecto de rebote en el sujeto. En aun otra forma de realización, el anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención permite aliviar el dolor durante un período prolongado en un sujeto; por ejemplo, el anticuerpo permite aliviar el dolor durante un período de al menos entre aproximadamente una semana y aproximadamente doce semanas (o entre una semana y doce semanas), después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En una forma de realización, el anticuerpo

alivia el dolor durante un período de al menos aproximadamente una semana (o al menos una semana) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En otra forma de realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de al menos aproximadamente dos semanas (o al menos dos semanas) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En otra forma de realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de al menos aproximadamente cuatro semanas (o al menos cuatro semanas) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En otra forma de realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de al menos aproximadamente ocho semanas (o al menos ocho semanas) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En otra forma de realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de al menos aproximadamente doce semanas (o al menos doce semanas) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En otra forma de realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de entre al menos aproximadamente cuatro semanas y aproximadamente doce semanas (o durante un período de entre cuatro semanas y doce semanas) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En otra forma de realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de entre al menos aproximadamente ocho semanas y aproximadamente doce semanas (o durante un período de entre ocho semanas y doce semanas) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto.

La capacidad del anticuerpo de aliviar el dolor en un sujeto puede evaluarse usando ensayos establecidos en la técnica. Los modelos animales apropiados para evaluar la duración del alivio del dolor por parte de un anticuerpo anti-NGF se describen, por ejemplo, en la Publicación PCT N° WO 2006/131951 y la Publicación de Patente de los EEUU 20080182978. Los ejemplos no limitativos de dichos modelos animales incluyen el modelo del dolor neuropático provocado por la constricción crónica del nervio ciático, el

modelo del dolor post-quirúrgico, que abarca una incisión en la pata trasera, el modelo de dolor provocado por la artritis reumática, que abarca una artritis inducida con el coadyuvante completo de Freund (CFA), y los modelos del dolor provocado por el cáncer, tales como el que se describe en Halvorson, K.G. et al. (2005) *Cancer Res.* 65:9426-9435 y Sevcik, M.A. et al. (2005) *Pain* 115:128-141. Más aun, el alivio del dolor podrá evaluarse clínicamente en los seres humanos, y la duración del alivio del dolor podrá determinarse sobre la base de los niveles de dolor informados por los uno o más sujetos humanos que estén siendo tratados con el anticuerpo anti-NGF.

En aun otras formas de realización, un anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención puede comprender una región variable de la cadena pesada y/o región variable de la cadena liviana de un anticuerpo anti-NGF que se preparan con un método convencional conocido en la técnica para producir anticuerpos monoclonales, tal como el procedimiento de hibridización de células somáticas convencionales descrito por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495, para crear anticuerpos monoclonales no humanos (anticuerpos que luego pueden humanizarse), así como con procedimientos donde se emplean bibliotecas de presentación en fagos o con métodos donde se emplean animales transgénicos en los que se expresan genes de inmunoglobulinas humanas. Los procedimientos donde se emplean bibliotecas de presentación en fagos para seleccionar anticuerpos se describen, por ejemplo, en 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, las Patentes de los EEUU N° 5223409, 5403484 y 5571698, de Ladner et al., las Patentes de los EEUU N° 5427908 y 5580717, de Dower et al., las Patentes de los EEUU N° 5969108 y 6172197, de McCafferty et al., y las Patentes de los EEUU N° 5885793, 6521404, 6544731, 6555313, 6582915 y 6593081, de Griffiths et al. Los métodos donde se usan animales transgénicos en los que se expresan genes de inmunoglobulinas humanas para crear anticuerpos se describen, por ejemplo, en Lonberg

et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg. N. y Huszar. D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93. Harding. F. y Lonberg. N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546, las Patentes de los EEUU N° 5545806, 5569825, 5625126, 5633425, 5789650, 5877397, 5661016, 5814318, 5874299 y 5770429, todas de Lonberg y Kay, la Patente de los EEUU N° 5545807, de Surani et al., las Publicaciones PCT N° WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay, la Publicación PCT WO 02/43478, de Ishida et al., y las Patentes de los EEUU N° 5939598, 6075181, 6114598, 6150584 y 6162963, de Kucherlapati et al.

En diversas formas de realización, un anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones de la invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. Más aun, el anticuerpo puede ser uno en el que se han eliminado los potenciales epitopes de las células T. En la técnica se han descrito métodos para eliminar los epitopes potenciales de las células T con el propósito de reducir la inmunogenicidad potencial de un anticuerpo (véase por ejemplo, la Publicación de Patente de los EEUU N° 20030153043, de Carr et al.).

Cualquier anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención puede derivatizarse o unirse a otras moléculas funcionales (por ejemplo, otro péptido u otra proteína). Por lo tanto, los anticuerpos o las porciones de anticuerpos de la invención han de incluir a las formas derivatizadas o modificadas de otra manera de los anticuerpos PG110 que se describen en la presente. Por ejemplo, un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención pueden unirse funcionalmente (mediante un acoplamiento químico, una fusión genética, una asociación no covalente o de otro tipo) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o un péptido capaz de mediar en la asociación del anticuerpo o la porción de anticuerpo a otra molécula (tal como la región nuclear de la estreptavidina o una marca de polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce mediante el entrecruzamiento de dos o más

anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de entrecruzamiento apropiados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos con reactividades diferentes separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, el éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), o homobifuncionales (por ejemplo, el suberato de disuccinimidilo). Dichos agentes de entrecruzamiento están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Los agentes detectables útiles con los que puede derivatizarse un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención incluyen los compuestos fluorescentes. Los ejemplos de agentes fluorescentes detectables incluyen la fluoresceína, el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, el cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonilo, la ficoeritrina y semejantes. Un anticuerpo también puede derivatizarse con enzimas detectables, tales como la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano, la glucosa oxidasa y semejantes. Cuando se derivatiza un anticuerpo con una enzima detectable, se lo detecta agregando reactivos adicionales que pueden ser usados por la enzima para generar un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano, el agregado de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina da como resultado un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede derivatizarse con biotina, y puede detectarse a través de una medición indirecta de la unión con avidina o estreptavidina.

IV. Producción de los anticuerpos

Los anticuerpos anti-NGF que han de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención pueden producirse usando moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-NGF. 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 está "aislado" o se lo ha "obtenido sustancialmente puro" cuando se lo purifica a partir de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, que incluyen

un tratamiento alcalino/con SDS, el bandeo con CsCl, la cromatografía en columna, la electroforesis en gel de agarosa y otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Véanse F. Ausubel, et al., editores (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de esta invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN, y puede contener o no secuencias intrónicas. En una forma de realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc. Los ácidos nucleicos de esta invención pueden obtenerse usando técnicas convencionales de biología molecular.

En una forma de realización, un anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 11. En otra forma de realización, un anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 14.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden someterse a una manipulación adicional mediante técnicas convencionales de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de la región variable en genes de anticuerpos completos, de modo que la región variable quede unida operativamente a la región constante (véase por ejemplo, el ejemplo 1). El término “unidos operativamente”, como se lo usa en este contexto, denota que los dos fragmentos de ADN se asocian de modo que las secuencias de aminoácidos que están codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen quedan en el mismo marco.

Los anticuerpos que han de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención pueden producirse en una célula huésped usando métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202). Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, puede insertar el ADN que codifica las cadenas pesada y liviana en vectores de expresión, de modo que los genes estén unidos operativamente a secuencias de

control de la transcripción y la traducción. En este contexto, el término “unido operativamente” denota que el gen del anticuerpo está unido en un vector, de manera tal que las secuencias de control de transcripción y la traducción en el vector cumplen con su función de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan de modo que sean compatibles con la célula huésped usada para la expresión. El gen de la cadena liviana de anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores separados, o más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes para el anticuerpo se insertan en el vector de expresión con métodos convencionales (por ejemplo, la unión en sitios de restricción complementarios entre el fragmento de gen del anticuerpo y el vector, o bien la unión de extremos romos, si no hay sitios de restricción presentes). Además, el vector de expresión recombinante podrá codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo desde la célula huésped. El gen de la cadena de anticuerpo podrá clonarse en el vector de manera tal que el péptido señal esté unido en el mismo marco al extremo amino del gen de la 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 la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes típicamente comprenden secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término “secuencia reguladora” ha de incluir los promotores, los potenciadores y otros elementos para controlar la expresión (por ejemplo, las señales de poliadenilación), que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Aquellos versados en la técnica han de apreciar que el diseño del vector de expresión, incluyendo la

selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se desea transformar, el nivel de expresión que se desea para la proteína, etcétera. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en las células huésped de mamíferos incluyen los elementos virales que presentan niveles de expresión altos de las proteínas en las células de mamíferos, tales como los promotores y/o los potenciadores que derivan de citomegalovirus (CMV), del virus de simio 40 (SV40), de adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío mayor del adenovirus (AdMLP)) y de poliomias. Como alternativa, pueden usarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la β -globina. Más aun, pueden emplearse elementos reguladores compuestos por secuencias de distintas fuentes, tales como el sistema promotor SR α , que contiene secuencias del promotor temprano SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de las células T humanas tipo 1 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden comprender secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y los genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, Patentes de los EEUU N° 4399216, 4634665 y 5179017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, el gen marcador de selección típicamente confiere resistencia a drogas, tales como G418, higromicina o metotrexato, a la célula huésped en la que se lo introduce. Los genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células huésped dhfr- con una selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).

Para la expresión de las cadenas livianas y pesadas, los uno o más vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y liviana se transfectan en una célula huésped mediante técnicas convencionales. Las distintas formas del término “transfección” han de

de abarcar una amplia variedad de técnicas que se usan comúnmente introducir ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, la electroporación, la precipitación con fosfato de calcio, la transfección con DEAE-dextrano y semejantes. A pesar de que teóricamente es posible expresar los anticuerpos en células huésped procariotas o eucariotas, la expresión de los anticuerpos en células eucariotas, y más preferiblemente en células huésped de mamíferos, resulta preferible, debido a que dichas células eucariotas, y particularmente las células de mamífero, son más eficientes que las células procariotas para ensamblar y secretar un anticuerpo plegado correctamente y activo desde el punto de vista inmunológico. Se ha informado que la expresión de genes de anticuerpos en procariotas no es efectiva para producir rendimientos elevados de anticuerpos activos (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de esta exposición incluyen las células de ovario de hámster chino (células CHO) (que incluyen las células CHO dhfr-, que se describen en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), la células de mieloma NSO, las células COS y las células SP2. Otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión GS, que se describe en WO 87/04462 (de Wilson), WO 89/01036 (de Bebbington) y EP 338841 (de Bebbington). Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo 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 que se desarrollan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas convencionales.

En una forma de realización, un anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención se produce usando un vector de expresión

que codifica un anticuerpo anti-NGF, donde el vector comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 11, que codifica una cadena pesada de anticuerpo, y la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 14, que codifica una cadena liviana de anticuerpo. Un vector de expresión preferido de la invención comprende el gen de GS (de la glutamina sintetasa). En otra forma de realización preferida, en la invención se provee una célula huésped que comprende un vector de expresión de la invención. Una célula huésped preferida de la invención es una célula CHO (de ovario de hámster chino).

En aun otra forma de realización preferida, el anticuerpo anti-NGF que ha de usarse en las composiciones farmacéuticas de la invención se produce cultivando una célula huésped que comprende un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 11 (que codifica una cadena pesada de anticuerpo) y la secuencia de nucleótidos de SEQ ID N° 14 (que codifica una cadena liviana de anticuerpo), de manera tal de expresar un anticuerpo anti-NGF que comprende una cadena pesada codificada por SEQ ID N° 11 y una cadena liviana codificada por SEQ ID N° 14.

V. Métodos de administración

Una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse con una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como han de apreciar aquellos versados en la técnica, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados que se deseen. En general, una composición farmacéutica de la invención es apropiada para la administración intravenosa, intraarticular, subcutánea, intramuscular, parenteral, intratumoral, intranasal, intravesicular, intrasinovial, oral, mucosal, sublingual, espinal o epidérmica, o para introducirla en las cavidades corporales (por ejemplo, el abdomen, la cavidad pleural, los senos nasales). En determinadas formas de realización preferidas, la composición farmacéutica de la invención es apropiada para la administración intravenosa, subcutánea (por ejemplo, por medio de una lanceta inyectora) o intraarticular.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse solas o en una terapia combinada, es decir, en combinación con otros agentes. Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir una composición de la presente invención con al menos uno o más agentes farmacéuticos adicionales. Por ejemplo, los al menos uno o más agentes farmacéuticos adicionales pueden administrarse de manera separada, o también pueden incorporarse en las composiciones. En una forma de realización preferida, se administra una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión al antígeno de éste, en combinación con un segundo agente farmacéutico, donde el segundo agente farmacéutico se selecciona de grupo que consiste en las NSAID, los analgésicos (lo que abarca los analgésicos opiáceos y los analgésicos atípicos), los anestésicos locales, los bloqueadores nerviosos, los bloqueadores de fenol, los anticuerpos terapéuticos, los esteroides, los anticonvulsivos, los antidepresivos, la capsaicina tópica y los agentes antivirales. Una clase particularmente preferida de los segundos agentes farmacéuticos que pueden usarse para aliviar el dolor abarca los analgésicos opiáceos. Adicionalmente o como alternativa, puede combinarse un segundo régimen de tratamiento con el uso de un anticuerpo de la invención, por ejemplo, en el alivio del dolor. Los ejemplos de dichos segundos regímenes de tratamiento incluyen la radioterapia (por ejemplo, para el dolor provocado por el cáncer), los procedimientos quirúrgicos (por ejemplo, los procedimientos de ablación del ganglio de Gasser y la ablación retrogaseriana (con aguja) para la neuralgia del trigémino), la hipnosis y la acupuntura.

Los ejemplos de NSAID incluyen los salicilatos acetilados, incluyendo la aspirina, los salicilatos no acetilados incluyendo el salsalato, el diflunisal, los ácidos acéticos, incluyendo el etodolac, el diclofenac, la indometacina, el ketorolac, la nabumetona, los ácidos propiónicos, incluyendo el fenoprofeno, el flurbiprofeno, el ibuprofeno, el ketoprofeno, el naproxeno, el naproxeno sódico, la oxaprozina, los fenamatos, incluyendo el meclofenamato, el ácido mefenámico, la fenilbutazona, el piroxicam, los inhibidores de

COX-2, incluyendo el celecoxib, el etoricoxib, el valdecoxib, el rofecoxib, el lumiracoxib. Los ejemplos de analgésicos incluyen el paracetamol (acetaminofeno), el tramadol, el tapentadol, la capsaicina (tópico), los analgésicos opiáceos y los analgésicos atípicos. Los ejemplos de analgésicos opiáceos incluyen la morfina, la codeína, la tebaína, la hidromorfona, la hidrocodona, la oxicodona, la oximorfona, la desomorfina, la diacetilmorfina, la nicomorfina, la dipropanoilmorfina, la bencilmorfina, la etilmorfina, el fentanilo, la petidina, la metadona, el tramadol y el propoxifeno. Los ejemplos de analgésicos atípicos, incluyen los antidepresivos tricíclicos, la carbacepina, la gabapentina, la pregabalina, la duloxetina y la cafeína. Los ejemplos de esteroides incluyen los corticoesteroides intraarticulares (IAC) y la prednisona. Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos incluyen los anticuerpos anti-TNF, tales como Remicade® y Humira®, y los anticuerpos anti-CD20, tales como Rituxan® y Arzerra™. Los ejemplos de agentes antivirales incluyen el aciclovir y el fosfato de oseltamivir (Tamiflu®).

En una forma de realización preferida, la terapia combinada puede incluir una composición farmacéutica con un anticuerpo anti-NGF de la presente invención en combinación con al menos uno o más inhibidores de TrkA (por ejemplo, compuestos que antagonizan la actividad de TrkA). Los inhibidores de TrkA pueden operar, por ejemplo, a través de una interacción extracelular con el receptor de TrkA, o a través de una interacción intracelular con la maquinaria de transducción de señales de TrkA (por ejemplo, mediante la inhibición de la actividad de quinasa de TrkA). Los ejemplos ilustrativos de inhibidores extracelulares de TrkA incluyen los anticuerpos anti-TrkA (tales como los anticuerpos anti-TrkA humanizados que se describen en la Publicación de Patente de los EEUU N° 20090208490 y la Publicación de Patente de los EEUU N° 20090300780) y los peptidomiméticos del NGF que antagonizan TrkA (tales como los que se describen en Debeir, T. et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4067-4072). Los ejemplos ilustrativos de inhibidores intracelulares de TrkA incluyen los péptidos que penetran en las células y que antagonizan la función de TrkA (por ejemplo, como se

describe en Hirose, M. et al. (2008) J. Pharmacol. Sci. 106:107-113; Ueda, K. et al. (2010) J. Pharmacol. Sci., 30 de Marzo de 2010) y las moléculas pequeñas inhibidoras, tales como los inhibidores de la actividad de quinasa de TrkA (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 ilustrativos de inhibidores de TrkA incluyen ARRY-470 y ARRY-872 (Array Biopharma).

En otra forma de realización preferida, la terapia combinada puede incluir una composición farmacéutica con un anticuerpo anti-NGF de la presente invención en combinación con al menos uno o más inhibidores de la proteína quinasa C (PKC) (por ejemplo, compuestos que antagonizan la actividad de PKC).

Las formulaciones inyectables estériles de las composiciones farmacéuticas de la invención pueden prepararse incorporando el compuesto activo con uno o más ingredientes (por ejemplo, un amortiguador, un excipiente, etcétera) como los que se enumeraron con anterioridad, según sea necesario, a lo que seguirá una esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes necesarios como los que se enumeraron con anterioridad. En el caso de los polvos estériles para preparar soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización), con el que puede producirse un polvo del ingrediente activo en combinación con cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución estéril, con la filtración previa del ingrediente activo adicional.

Convenientemente, las formulaciones pueden presentarse en formas de dosificación individuales, y pueden prepararse con cualquier método conocido en la técnica de la farmacia. Las formas de dosificación individuales, como se las usa en la presente, hacen referencia a unidades físicamente discretas que son apropiadas como dosis individuales para los sujetos que se desea tratar. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada

del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado.

Los niveles de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención podrán modificarse de modo de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para obtener la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particular, sin toxicidad para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, que incluirán la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, o del éster, la sal o la amida correspondiente, la ruta de administración, el cronograma de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otras drogas, compuestos y/o materiales que se usen en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y la historia clínica previa del paciente que esté siendo tratado, y factores similares bien conocidos en la técnica médica. Un médico o un veterinario versado en la técnica han de poder determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz necesaria de la composición farmacéutica. Por ejemplo, el médico o el veterinario han de poder comenzar con dosis de los compuestos de la invención que se empleen en la composición farmacéutica en niveles más bajos que los necesarios, con el propósito de alcanzar el efecto terapéutico deseado, y luego incrementar gradualmente la dosificación hasta obtener el efecto deseado. En general, una dosis diaria apropiada de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la menor dosis eficaz para producir el efecto terapéutico. Una dosis eficaz generalmente dependerá de los factores que se describieron con anterioridad.

En una forma de realización, una cantidad eficaz de la composición de la presente invención es una cantidad que inhibe la actividad del NGF en un sujeto que sufre un trastorno en el que la actividad del NGF es perjudicial. En una forma de realización, la composición provee una dosis eficaz de 100 mg del anticuerpo por inyección. En otra

forma de realización, la composición provee una dosis eficaz que varía entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 100 mg del anticuerpo. Si se lo desea, la dosis eficaz diaria de la composición farmacéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis, que se administran por separado en intervalos apropiados durante el día, opcionalmente en formas de dosificación individuales.

En una forma de realización de la invención, la dosis del anticuerpo en la composición es de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 150 mg. En otra forma de realización, la dosis del anticuerpo en la composición es de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 100 mg. En otra forma de realización, la dosis del anticuerpo en la composición es de entre aproximadamente 40 y aproximadamente 80 mg. En otra forma de realización, la dosis del anticuerpo en la composición es de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 mg. En otra forma de realización, la dosis del anticuerpo en la composición es de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 0,5 y 75 mg, entre aproximadamente 1,0 y 60 mg, entre aproximadamente 5 y 40 mg, entre aproximadamente 10 y 30 mg o entre aproximadamente 10 y 20 mg. La composición es especialmente apropiada para proveer grandes dosis del anticuerpo, de más de 10 mg. En una forma de realización particular de la invención, la composición provee el anticuerpo en una dosis de aproximadamente 10 mg o aproximadamente 20 mg. En otra forma de realización, la composición provee el anticuerpo en una dosis de aproximadamente 80 mg o aproximadamente 100 mg.

En una forma de realización de la invención, la dosis del anticuerpo en la composición es de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 150 mg, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 150 mg, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 145 mg, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 140 mg, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 135 mg, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 130 mg, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 125 mg, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 120 mg, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 115 mg, entre

aproximadamente 40 y aproximadamente 110 mg, entre aproximadamente 45 y aproximadamente 105 mg, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 mg, entre aproximadamente 55 y aproximadamente 95 mg, entre aproximadamente 60 y aproximadamente 90 mg, entre aproximadamente 65 y aproximadamente 85 mg o entre aproximadamente 70 y aproximadamente 80 mg, o de aproximadamente 75 mg. En una forma de realización, la dosis del anticuerpo es de 10 mg. En una forma de realización, la dosis del anticuerpo es de 20 mg. Dentro del alcance de esta invención también se contemplan los rangos intermedios de las dosis mencionadas con anterioridad, por ejemplo, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 149 mg. Por ejemplo, han de quedar incluidos los rangos de valores donde se use una combinación de cualquiera de los valores mencionados con anterioridad como límites superiores y/o inferiores.

Es posible seleccionar un dispositivo de administración apropiado para determinadas rutas de administración particulares. Por ejemplo, para la administración subcutánea o intramuscular, podrá usarse una lanceta de inyección (por ejemplo, una que permita la auto-administración). Estas lancetas de inyección, que también se conocen como inyectores, son conocidas en la técnica e incluyen las que contienen una dosis líquida del anticuerpo (tales como las que se describen en la Publicación PCT WO 2008/005315). Para la administración subcutánea, también puede usarse un implante subcutáneo. Adicionalmente, la administración transcutánea puede efectuarse mediante el uso de un parche tópico cutáneo (para la piel; por ejemplo, un parche adhesivo). La administración transcutánea también puede realizarse mediante la inyección de un polvo seco (como es el caso de los inyectores disponibles comercialmente en Glide Pharma). Adicionalmente, para la administración en los pulmones (por ejemplo, en el tratamiento del asma o de la tos intratable), puede recurrirse a la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o un nebulizador, o a una composición con un agente aerosolizante. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EEUU N° 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 y 4880078 y las Publicaciones PCT N° WO

92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903

En una forma de realización preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin agujas, tal como los dispositivos que se describen en las Patentes de los EEUU N° 5399163, 5383851, 5312335, 5064413, 4941880, 4790824 ó 4596556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos de utilidad en la presente invención incluyen los que se describen en la Patente de los EEUU N° 4487603: una bomba de micro-infusión implantable para administrar una medicación a una velocidad controlada, en la Patente de los EEUU N° 4486194: un dispositivo terapéutico para realizar la administración a través de la piel, en la Patente de los EEUU N° 4447233: una bomba de infusión para medicación que permite realizar la administración con una velocidad de infusión precisa, en la Patente de los EEUU N° 4447224: un aparato de infusión de flujo variable para realizar una administración continua de la droga, en la Patente de los EEUU N° 4439196: un sistema de administración de drogas por vía osmótica con compartimientos con múltiples recámaras, y en la Patente de los EEUU N° 4475196: un sistema de administración de drogas por vía osmótica. Aquellos versados en la técnica han de conocer otros implantes, sistemas de administración y módulos diversos.

En determinadas formas de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden formularse para asegurar una distribución apropiada in vivo. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención atraviesen la BHE (si se lo desea), es posible formularlos, por ejemplo, en liposomas. Para hallar métodos para elaborar liposomas, véanse, por ejemplo, Patentes de los EEUU 4522811, 5374548 y 5399331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que son transportadas de manera selectiva a al interior de las células y los órganos, con lo que se potencia la administración dirigida de la droga (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Los ejemplos de los grupos de administración dirigida incluyen el

folato o la biotina (véase, por ejemplo, la Patente de los EEUU 5416016, de Low et al.), los manósidos (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038), los anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180), los agentes tensioactivos dirigidos al receptor de la proteína A (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), las distintas especies que pueden incluirse en las formulaciones de la invención, así como los componentes de las moléculas inventadas, por ejemplo, p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véanse también K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proveer la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o puede reducirse o incrementarse la dosis de manera proporcional, según sea necesario para la situación terapéutica. Una dosis única típica (que puede administrarse en un plan de dosificación como se describirá con mayor detalle más adelante) puede hallarse en el rango de aproximadamente entre 0,1 µg/kg y 1 µg/kg, 3 µg/kg, 30 µg/kg, 300 µg/kg, 3000 µg/kg (3 mg/kg), o entre 30 mg/kg y 100 mg/kg, o más, dependiendo de los factores que se describen en la presente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF puede administrarse a razón de 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 forma de realización preferida, el anticuerpo anti-NGF se administra en una dosis en un rango de entre aproximadamente 3 µg/kg y aproximadamente 3000 µg/kg. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo anti-NGF se administra en una dosis de 100 µg/kg. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo anti-NGF se administra en una dosis de 200 µg/kg. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo anti-NGF se

administra en una dosis de 300 µg/kg. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo anti-NGF se administra en una dosis de 400 µg/kg.

Para las administraciones repetidas durante varios días, semanas o meses, o durante más tiempo, dependiendo de la afección, el tratamiento se continúa hasta que se obtiene la supresión deseada de los síntomas o hasta que se alcanzan niveles terapéuticos suficientes (por ejemplo, para reducir el dolor). Un ejemplo de un régimen de dosificación comprende la administración de una dosis inicial en un rango de entre aproximadamente 3 µg/kg y 500 µg/kg, seguida por una dosis de mantenimiento mensual de entre aproximadamente 3 µg/kg y 500 µg/kg del anticuerpo anti-NGF. En otra forma de realización, se administra una dosis de aproximadamente 200 µg/kg una vez por mes. En aun otra forma de realización, se administra una dosis de aproximadamente 400 µg/kg una vez cada dos meses. Sin embargo, podrán ser útiles otros regímenes de dosificación, dependiendo del patrón de decaimiento farmacocinético que el médico desee alcanzar. Por ejemplo, en algunas formas de realización, se contempla la dosificación entre una a cuatro veces por semana. Sin embargo, debido a la duración prolongada del alivio del dolor que producen los anticuerpos anti-NGF, puede usarse una dosificación menos frecuente. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-NGF se administra una vez por semana, cada 2 semanas, cada 3 semanas, cada 4 semanas, cada 5 semanas, cada 6 semanas, cada 7 semanas, cada 8 semanas, cada 9 semanas, cada 10 semanas, cada 15 semanas, cada 20 semanas, cada 25 semanas, cada 26 semanas, o con una frecuencia aun mayor. En algunas formas de realización, el anticuerpo anti-NGF se administra cada mes, cada 2 meses, cada 3 meses, cada 4 meses, cada 5 meses, cada 6 meses, o con una frecuencia aun mayor.

En una forma de realización preferida, el anticuerpo anti-NGF es el anticuerpo PG110 o un fragmento de unión al antígeno de éste, y se administra (por ejemplo, a un ser humano) por vía intravenosa, en una dosis en el rango de entre 0,1 mg/kg y 0,2 mg/kg, preferiblemente de 0,15 mg/kg, cada 12 semanas. En otra forma de realización preferida,

el anticuerpo anti-NGF de la invención se administra (por ejemplo, a un ser humano) por vía subcutánea en una dosis en el rango de entre 0,2 mg/kg y 0,4 mg/kg, preferiblemente de 0,3 mg/kg, cada doce semanas. En aun otras formas de realización, PG110 o un fragmento de éste se administra en una dosis en el rango de entre 0,1 mg/kg y 30 mg/kg, o en un rango de entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg, o en un rango de entre 0,1 mg/kg y 10 mg/kg, o en un rango de entre 1 mg/kg y 30 mg/kg, o en un rango de entre 1 mg/kg y 20 mg/kg, o en un rango de entre 1 mg/kg y 10 mg/kg.

Resulta especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en formas de dosificación individuales facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Las formas de dosificación individuales, como se las usa en la presente, hacen referencia a unidades físicamente discretas que son apropiadas como dosis individuales para los sujetos que se desea tratar. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en combinación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones de las formas de dosificación individuales de la invención están dictadas (a) por las características únicas del compuesto activo y por el efecto terapéutico particular que se desea obtener, así como (b) por las limitaciones inherentes en la técnica de la formulación de dicho compuesto activo para el tratamiento, con relación a la sensibilidad en los individuos, y también dependen de dichos factores. Por ejemplo, los ejemplos ilustrativos de formas de dosificación individuales incluyen 0,2 mg (que corresponden 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).

V. Métodos de uso

En la invención se proveen composiciones estables con concentraciones elevadas que presentan una vida de almacenamiento extendida. En una forma de realización, se las usa para inhibir la actividad del NGF en un sujeto que sufre un trastorno en el que la

actividad del NGF es perjudicial. Los métodos generalmente comprenden administrarle al sujeto una composición de la invención para reducir o inhibir la actividad del NGF en el sujeto. Preferiblemente, el NGF es el NGF humano y el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero donde se expresa un NGF con el que también puede reaccionar un anticuerpo de la invención. Adicionalmente, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido el hNGF (por ejemplo, mediante la administración del hNGF o a través de la expresión de un transgen del hNGF). Más aun, una composición de la invención puede administrarse en un mamífero no humano en el que se expresa un NGF con el que también reacciona el anticuerpo (por ejemplo, un primate, un cerdo o un ratón), para propósitos veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad humana. En este último caso, los modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, para evaluar las dosis y el transcurso de la administración).

Una composición de la invención puede administrársele a un sujeto humano para propósitos terapéuticos o profilácticos. Por consiguiente, en otro aspecto, en la invención se provee un método para tratar, por ejemplo, atenuar o inhibir, una enfermedad o una afección relacionada con el NGF en un sujeto, donde el método comprende administrarle al sujeto una composición farmacéutica de la invención. Preferiblemente, el anticuerpo anti-NGF se usa para atenuar o aliviar el dolor, por ejemplo, el dolor asociado a una enfermedad o una afección donde el desarrollo o mantenimiento del dolor es mediado, al menos en parte, por el NGF. Los ejemplos ilustrativos de enfermedades o afecciones relacionadas con el NGF incluyen el dolor inflamatorio, el dolor postquirúrgico, el dolor postoperatorio (incluyendo el dolor de dientes), el dolor neuropático, la neuropatía periférica, la neuropatía diabética, el dolor por fractura, el dolor de las articulaciones por gota, la neuralgia post-herpética, el dolor debido al cáncer, la osteoartritis, el dolor debido a la artritis reumática, la ciática, los dolores asociados con las crisis de las células falciformes, los dolores de cabeza (por ejemplo, las migrañas, el dolor de cabeza por

tensión, el dolor de cabeza en racimos), la dismenorrea, la endometriosis, el fibroma uterino, el dolor musculoesquelético, la lumbalgia crónica, la fibromialgia, las torceduras, el dolor visceral, los quistes de ovario, la prostatitis, el síndrome de dolor pélvico crónico, la cistitis, la cistitis intersticial, el síndrome de la vejiga dolorosa y/o el síndrome de dolor en la vejiga, el dolor asociado a la prostatitis no bacteriana crónica, el dolor incisional, la migraña, la neuralgia del trigémino, el dolor debido a quemaduras y/o a heridas, el dolor asociado al trauma, el dolor asociado a las enfermedades musculoesqueléticas, la espondilitis anquilosante, las patologías periarticulares, el dolor debido a metástasis óseas, el dolor provocado por el VIH, la eritromelalgia, el dolor provocado por la pancreatitis o por los cálculos en riñón, el melanoma maligno, el síndrome de Sjogren, el asma, (por ejemplo, el asma no controlado con una hiper-respuesta severa de vías aéreas), la tos intratable, las enfermedades desmielinizantes, el alcoholismo crónico, los accidentes cerebrovasculares, el síndrome de dolor talámico, el dolor provocado por toxinas, el dolor debido a la quimioterapia, la fibromialgia, las enfermedades inflamatorias intestinales, el síndrome del colon irritable, los trastornos inflamatorios en los ojos, los trastornos inflamatorios o inestables en la vejiga, la psoriasis, las enfermedades de la piel con componentes inflamatorios, las quemaduras por el sol, la carditis, la dermatitis, la miositis, la neuritis, la enfermedad vascular del colágeno, las afecciones inflamatorias crónicas, el dolor inflamatorio y la hiperalgesia o la alodinia asociada, el dolor neuropático y la hiperalgesia o la alodinia asociada, el dolor neuropático diabético, la causalgia, el dolor mantenido por el sistema nervioso simpático, los síndromes de denervación, el daño o la disfunción del tejido epitelial, las alteraciones en la motilidad visceral en las regiones respiratoria, genitourinaria, gastrointestinal o vascular, las reacciones alérgicas de la piel, el prurito, el vitíligo, los trastornos gastrointestinales generales, la colitis, la ulceración gástrica, las úlceras duodenales, las rinitis vasomotora o alérgica, los trastornos bronquiales, las dispepsia, el reflujo gastroesofágico, la pancreatitis y la visceralgia.

Adicionalmente, el NGF ha sido relacionado con la proliferación de cánceres, tales como

el cáncer de próstata, el cáncer de tiroides, el cáncer de pulmones, el prolactinoma y el melanoma. De este modo, en otra forma de realización, la enfermedad o la afección relacionada con el NGF que pueden tratarse con una composición farmacéutica de la invención son un cáncer, preferiblemente el cáncer de próstata, el cáncer de tiroides, el cáncer de pulmones, el prolactinoma o el melanoma. Por lo tanto, en otra forma de realización, en la invención también se provee un método para tratar el cáncer en un sujeto, preferiblemente el cáncer de próstata, el cáncer de tiroides, el cáncer de pulmones, el prolactinoma o el melanoma, que comprende administrarle al sujeto un anticuerpo anti-NGF de la invención.

Aun más, en otra forma de realización, la enfermedad o la afección relacionada con el NGF pueden ser el VIH/SIDA. El bloqueo del NGF con un anticuerpo anti-NGF de la invención puede bloquear los macrófagos infectados con el VIH, con el propósito de tratar el VIH/SIDA. Por consiguiente, en otra forma de realización, en la invención también se provee un método para tratar el VIH/SIDA en un sujeto, que comprende administrarle al sujeto una composición farmacéutica de la invención.

Las enfermedades y las afecciones particularmente preferidas para el tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención incluyen el dolor inflamatorio (particularmente el dolor provocado por la osteoartritis o por la artritis reumática), el dolor musculoesquelético (particularmente la lumbalgia crónica), el dolor neuropático (particularmente el dolor neuropático diabético), el dolor debido a metástasis óseas, la cistitis intersticial/el síndrome de la vejiga dolorosa, el dolor asociado a la prostatitis no bacteriana crónica, el dolor asociado a la endometriosis y/o a los fibromas uterinos y el dolor postoperatorio.

El dolor y/u otros síntomas asociados a la endometriosis y/o a los fibromas uterinos pueden comprender la dismenorrea, el dolor pélvico crónico no menstrual, la dispareunia, la disquencia, la menorragia, el dolor abdominal o la lumbalgia, la infertilidad y la fertilidad disminuida, la disuria, la hinchazón y el dolor por micción, las náuseas, los vómitos y/o la diarrea. Los síntomas también pueden comprender síntomas relacionados con las

lesiones en el endometrio o con los fibromas uterinos localizados en el exterior de la cavidad peritoneal, lo que incluye, por ejemplo, el síndrome de la endometriosis torácica, que se manifiesta como hemoptisis, neumotórax o hemotórax, y la leiomiosis pulmonar, que se manifiesta como disnea y una masa pulmonar.

En una forma de realización particularmente preferida, se usa una composición farmacéutica de la invención para tratar el dolor. Preferiblemente, el tipo de dolor que se trata se selecciona del grupo que consiste en el dolor debido a la osteoartritis, la lumbalgia crónica, el dolor neuropático diabético, el dolor provocado por el cáncer y el dolor asociado a la endometriosis y/o a los fibromas uterinos. Por ende, en una forma de realización preferida, en la invención se provee un método para tratar el dolor en un sujeto, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención de modo de tratar el dolor. Preferiblemente, el dolor se selecciona del grupo que consiste en dolor debido a la osteoartritis, la lumbalgia crónica, el dolor neuropático diabético, el dolor provocado por el cáncer y el dolor asociado a la endometriosis y/o a los fibromas uterinos. Por lo tanto, en una forma de realización, en la invención se provee un método para tratar el dolor debido a la osteoartritis en un sujeto, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención de modo de tratar el dolor debido a la osteoartritis en el sujeto. En otra forma de realización, en la invención se provee un método para tratar el dolor crónico de la porción baja de la espalda en un sujeto, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención de modo de tratar el dolor crónico de la porción baja de la espalda en el sujeto. En aun otra forma de realización, en la invención se provee un método para tratar el dolor neuropático debido a la diabetes en un sujeto, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención de modo de tratar el dolor neuropático debido a la diabetes. En aun otra forma de realización, en la invención se provee un método para tratar el dolor debido al cáncer en un sujeto, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención de modo de tratar el dolor debido al cáncer en el sujeto. En aun otra forma de realización, en la invención se

proporciona un método para tratar el dolor asociado a la endometriosis y/o a los fibromas uterinos en un sujeto, que comprende administrar una composición farmacéutica de la invención de modo de tratar el dolor asociado a la endometriosis y/o a los fibromas uterinos en el sujeto.

En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de la IgG4 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 10, y que alivia el dolor en el sujeto al que se administra el anticuerpo durante un período prolongado. Por ejemplo, en una forma de realización, el anticuerpo anti-NGF de la invención alivia el dolor durante un período prolongado en el sujeto, por ejemplo, el anticuerpo permite aliviar el dolor durante un período de al menos entre aproximadamente una semana y aproximadamente doce semanas (o entre una semana y doce semanas), después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En una forma de realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de al menos aproximadamente una semana (o al menos una semana) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En otra forma de realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de al menos aproximadamente dos semanas (o al menos dos semanas) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En otra forma de realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de al menos aproximadamente cuatro semanas (o al menos cuatro semanas) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En otra forma de realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de al menos aproximadamente ocho semanas (o al menos ocho semanas) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto. En otra forma de realización, el anticuerpo alivia el dolor durante un período de al menos aproximadamente doce semanas (o al menos doce semanas) después de la administración de una sola dosis del anticuerpo anti-NGF al sujeto.

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

En otra forma de realización, la composición farmacéutica de la invención se administra en combinación con un segundo agente farmacéutico o un segundo régimen de tratamiento. El anticuerpo y el segundo agente, o el anticuerpo y el segundo régimen de tratamiento, pueden administrarse o aplicarse simultáneamente, o como alternativa, primero puede administrarse el anticuerpo, seguido por el segundo agente farmacéutico o el segundo régimen, o primero puede administrarse o aplicarse el segundo agente farmacéutico o el segundo régimen, seguido por el anticuerpo. En la sección precedente relacionada con las composiciones farmacéuticas, se detallaron ejemplos ilustrativos de los segundos agentes farmacéuticos y los segundos regímenes de tratamiento apropiados. En particular, los segundos agentes farmacéuticos preferidos para el uso en combinación con un anticuerpo de la invención son los analgésicos opiáceos. Otros segundos agentes farmacéuticos preferidos para el uso en combinación con un anticuerpo de la invención son los inhibidores de TrkA (por ejemplo, los inhibidores extracelulares de TrkA o los inhibidores intracelulares de TrkA, como se describe en detalle en la sección relacionada con las composiciones farmacéuticas) y los inhibidores de la proteína quinasa C (PKC).

En aun otro aspecto, en la invención se provee un método para atenuar o inhibir una enfermedad o una afección relacionada con el factor de crecimiento del nervio (NGF) en un sujeto, con el fin de evitar el efecto de rebote en el sujeto, donde el método comprende

administrarle al sujeto una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-NGF que comprende una región constante de la IgG4 humana, donde la región constante de la IgG4 humana comprende una mutación (preferiblemente una mutación en la región de la bisagra) y donde el anticuerpo tiene una vida media de eliminación terminal en un mono Cynomolgus de al menos 15 días. En otra forma de realización, el anticuerpo tiene una vida media de eliminación terminal en un mono Cynomolgus en el rango de entre aproximadamente 15 días y aproximadamente 22 días (o en un rango de entre 15 y 22 días), o en un rango de entre aproximadamente 15 días y aproximadamente 28 días (o en un rango de entre 15 y 28 días), o en un rango de entre aproximadamente 21 días y aproximadamente 28 días (o en un rango de entre 21 y 28 días). En otra forma de realización, el anticuerpo tiene una vida media de eliminación terminal en una rata de al menos 8 días. En aun otra forma de realización, el anticuerpo tiene una vida media de eliminación terminal promedio en los seres humanos de al menos entre 10 y 30 días (o de 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 rango de entre aproximadamente 10 días y aproximadamente 40 días, o en un rango de entre 10 y 40 días, o en un rango de entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 días, o en un rango de entre 15 y 30 días). Las mutaciones preferidas incluyen las que se describieron en detalle con anterioridad. Los anticuerpos preferidos incluyen los anticuerpos anti-NGF de las secuencias, y/o los que tienen propiedades funcionales como las que se describieron en detalle con anterioridad.

VI. Artículos de manufactura

Dentro del alcance de la presente invención también se halla una lanceta autoinyectora, una jeringa rellena con antelación o un dispositivo de administración libre de agujas que comprenden la composición farmacéutica líquida de la invención. En una forma de realización, la invención se relaciona con un dispositivo de administración que comprende una dosis de la composición que comprende 100 mg/ml de un anticuerpo anti-NGF

humano o de una porción de unión al antígeno de éste, por ejemplo, una lanceta autoinyectora o una jeringa rellena con antelación que comprenden una dosis de aproximadamente 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg, 20 mg, 21 mg, 22 mg, 23 mg, 24 mg, 25 mg, 26 mg, 27 mg, 28 mg, 29 mg, 30 mg, 31 mg, 32 mg, 33 mg, 34 mg, 35 mg, 36 mg, 37 mg, 38 mg, 39 mg, 40 mg, 41 mg, 42 mg, 43 mg, 44 mg, 45 mg, 46 mg, 47 mg, 48 mg, 49 mg, 50 mg, 51 mg, 52 mg, 53 mg, 54 mg, 55 mg, 56 mg, 57 mg, 58 mg, 59 mg, 60 mg, 61 mg, 62 mg, 63 mg, 64 mg, 65 mg, 66 mg, 67 mg, 68 mg, 69 mg, 70 mg, 71 mg, 72 mg, 73 mg, 74 mg, 75 mg, 76 mg, 77 mg, 78 mg, 79 mg, 80 mg, 81 mg, 82 mg, 83 mg, 84 mg, 85 mg, 86 mg, 87 mg, 88 mg, 89 mg, 90 mg, 91 mg, 92 mg, 93 mg, 94 mg, 95 mg, 96 mg, 97 mg, 98 mg, 99 mg, 100 mg, 101 mg, 102 mg, 103 mg, 104 mg o 105 mg de la composición.

Dentro del alcance de la presente invención también se hallan los conjuntos de elementos que comprenden las composiciones farmacéuticas de la invención en forma líquida o liofilizada, y que opcionalmente incluyen instrucciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad o una afección relacionada con el NGF. Los conjuntos de elementos pueden incluir una etiqueta donde se indica el uso apropiado del contenido del conjunto de elementos. El término etiqueta abarca cualquier inscripción, materia de comercialización o material anotado provisto en el conjunto de elementos o con él, o que acompaña de otro modo al conjunto de elementos.

Por ejemplo, en la invención también se provee una composición farmacéutica de la invención envasada en un conjunto de elementos o en un artículo de manufactura. El conjunto de elementos o el artículo de manufactura de la invención contienen materiales útiles para el tratamiento, lo que abarca la prevención, el tratamiento y/o el diagnóstico de una enfermedad o una afección relacionada con el NGF en un sujeto. En formas de realización preferidas, la enfermedad o la afección relacionada con el NGF son el dolor inflamatorio (particularmente el dolor provocado por la osteoartritis o por la artritis

reumática), el dolor musculoesquelético (particularmente la lumbalgia crónica), el dolor neuropático (particularmente el dolor neuropático diabético), el dolor debido al cáncer (particularmente el dolor debido a metástasis óseas), el dolor asociado a la endometriosis y/o a los fibromas uterinos y el dolor postoperatorio. El conjunto de elementos o artículo de manufactura comprenden un envase y una etiqueta o instrucciones de empleo, o bien un material impreso sobre o el envase o asociado a él, donde se provee información relacionado con el uso del anticuerpo anti-NGF (por ejemplo, PG110) en el tratamiento de una enfermedad o una afección relacionada con el NGF, como se describe en la presente. Un conjunto de elementos o un artículo de fabricación hacen referencia a un producto envasado que comprende los componentes con los cuales se administran las composiciones farmacéuticas de la invención para el tratamiento de una enfermedad o una afección relacionada con el NGF. Preferiblemente el conjunto de elementos comprende una caja o un recipiente que contienen los componentes del conjunto de elementos, y también puede incluir un protocolo para administrar la composición farmacéutica y/o "instrucciones de empleo". La caja o recipiente contienen los componentes de la invención, que preferiblemente están contenidos dentro de un recipiente de plástico, polietileno, polipropileno, etileno o propileno. Por ejemplo, los recipientes apropiados para la composición farmacéutica de la invención incluyen, por ejemplo, las botellas, los tubos, las jeringas, las lancetas, etcétera.

El término "instrucciones de empleo" se usa para hacer referencia a las instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de los productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias con relación al uso de dichos productos terapéuticos. En una forma de realización, las instrucciones de empleo de la invención informan al lector, lo que abarca el sujeto, por ejemplo, el consumidor que administrará la composición farmacéutica de la invención para el tratamiento, que la composición farmacéutica de la invención está indicada para el tratamiento de una enfermedad o una

afección relacionada con el NGF, como se describe en la presente. En una forma de realización, en las instrucciones de empleo se describen determinados beneficios terapéuticos de la composición farmacéutica de la invención, que incluyen el alivio del dolor. En otra forma de realización, las instrucciones de empleo pueden incluir una descripción de la dosificación del anticuerpo anti-NGF en la composición farmacéutica de la invención. En otra forma de realización, las instrucciones de empleo pueden incluir una descripción de la vía y la frecuencia de administración de la composición farmacéutica de la invención. En otra forma de realización, en las instrucciones de empleo de la invención también podrá proveerse información para los sujetos que recibirán la composición farmacéutica de la invención, donde dicha información podrá estar relacionada con las combinaciones de uso o con propósitos relacionados con la seguridad o la eficacia. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, el conjunto de elementos también comprende una segunda composición farmacéutica que comprende un agente terapéutico adicional, envasado o combinado con instrucciones para la administración de ambos agentes para el tratamiento de una enfermedad o una afección relacionada con el NGF. En particular, las enfermedades y las afecciones preferidas para el tratamiento con los conjuntos de elementos de la invención incluyen el dolor inflamatorio (particularmente el dolor provocado por la osteoartritis o por la artritis reumática), el dolor musculoesquelético (particularmente la lumbalgia crónica), el dolor neuropático (particularmente el dolor neuropático diabético), el dolor debido al cáncer, el dolor debido a metástasis óseas, el dolor asociado a la endometriosis y/o a los fibromas uterinos y el dolor postoperatorio. En los siguientes ejemplos se describen otras formas de realización de la presente invención. Dichos ejemplos no han de ser interpretados de manera limitativa. Los contenidos de los listados de secuencias, de las figuras y de todas las referencias, las patentes y las solicitudes de patentes publicadas que se citan en esta solicitud se incorporan expresamente a modo de referencia en la presente.

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos describen en detalle los experimentos realizados para examinar los efectos del pH de la solución, congelamiento-descongelamiento, concentración de la proteína PG110 y diversas soluciones amortiguadoras y excipientes sobre la estabilidad física y química de PG110 con el fin de desarrollar una formulación adecuada de PG110.

Se usaron los siguientes métodos analíticos en los experimentos que se condujeron para evaluar y monitorear la estabilidad de PG110 en solución.

Métodos generales

Las formulaciones de PG110 fueron evaluadas según parámetros de calidad generales (por ejemplo, el pH), parámetros de estabilidad física (por ejemplo, claridad, color, contaminación de partículas y pureza) y parámetros de estabilidad química, desamidación, oxidación, estabilidad química general y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Los ejemplos de pruebas incluyeron pruebas para la contaminación particulada visible, pruebas de recuento de partículas con opacidad para partículas subvisibles y pruebas para determinar pureza, tales como HPLC de exclusión por tamaño y enfoque isoelectrico capilar por imágenes.

La contaminación particulada (por ejemplo, partículas) se determinó por inspección visual.

Las partículas subvisibles fueron monitoreadas con el método de bloqueo de la luz de acuerdo con la Farmacopea de los EE.UU. (USP). Además, la estabilidad fisicoquímica de las formulaciones se evaluó por SEC que permite detectar fragmentos y agregados.

Para monitorear la estabilidad química, se empleó cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño (SE-HPLC) (para la detección de fragmentos e hidrólisis en una muestra de una formulación) e icIEF (enfoque isoelectrico capilar por imágenes).

Métodos icIEF

Los análisis de icIEF se condujeron usando el sistema cIEF de obtención de imágenes iCE280 con un muestreador automático PrinCE (Covergent Biosciences). En la siguiente Tabla 1 se enumeran los reactivos y materiales usados para los análisis icIEF.

Tabla 1

Reactivo	Proveedor	ID del producto
Solución de metilcelulosa al 1%	Convergent Bioscience	101876
Solución de metilcelulosa 0,5%	Convergent Bioscience	102505
Pharmalyte 3-10	GE healthcare	17-0456-01
H ₃ PO ₄ 0,08M en solución de metilcelulosa al 0,1% (anolito)	Convergent Bioscience	102506
NaOH 0,1M en solución de metilcelulosa al 0,1% (catolito)	Convergent Bioscience	102506
Marcador de pl 5,12	Convergent Bioscience	102224
Marcador de pl 9,22	Convergent Bioscience	102231

El instrumento iCE280 se operó de acuerdo con instrucciones del proveedor. Los viales respectivos se llenaron con soluciones recién preparadas de anolito y catolito, el vial de desechos se llenó con agua para HPLC MilliQ, y se encendió la lámpara de UV.

Los marcadores de pl se prepararon por dilución 10X de ambos marcadores de pl 5,12 y pl 9,22 con agua para HPLC MilliQ y se mezclaron bien.

Se prepararon muestras de PG110 para su análisis por dilución de muestras de prueba de PG110 hasta 1 mg/ml con agua para HPLC MilliQ, combinación de la solución de anticuerpos diluida con los componentes indicados en la siguiente tabla y breve agitación por vortexeo. A continuación, las muestras fueron transferidas a insertos de vidrio asentados en los tubos de un muestreador automático y se desgasearon por 5 minutos antes de colocarlas en un muestreador automático PrinCE.

Tabla 2

Componente	Volumen (µl)
Metilcelulosa 1%	70
Pharmalyte 3-10	8
Marcador de pI 5,12 diluido	8
Marcador de pI 9,22 diluido	8
Muestra 1 mg/ml	50
Agua	56

Métodos de HPLC de exclusión por tamaño

Se usó HPLC de exclusión por tamaño para determinar la pureza de las soluciones de PG110. El ensayo se condujo como se indica a continuación.

Se combinó un lecho protector de gel TSK (N° cat. 08543, 6,0 mm x 4,0 cm, 7 µm), con un gel TSK G3000SW (N° cat. 08541, 7,8 mm x 30 cm, 5 µm) y se corrió con un límite de presión de columna superior de 70 bar. La fase móvil consistía de Na₂HPO₄ 100 mM / Na₂SO₄ 200 mM, pH 7,0. Esta solución amortiguadora se creó por disolución de 49,68 g de fosfato ácido disódico anhidro y 99,44 g de sulfato de sodio anhidro en aproximadamente 3300 ml de agua Milli-Q, ajuste del pH en 7,0 usando ácido fosfórico 1 M, incremento del volumen de la solución amortiguadora a 3500 ml con agua Milli-Q y filtración de la solución a través de un filtro de membrana.

Se emplearon los siguientes parámetros experimentales:

- velocidad de flujo de 0,3 ml/min
- volumen de inyección de 20 µl (equivalente a 20 µg de muestra)
- columna a temperatura ambiente
- temperatura del muestreador automático de 2 a 8°C
- tiempo de corrida de 50 minutos
- gradiente isocrático

La detección se efectuó usando un detector por arreglo de diodos usando una longitud de onda de 214 nm ($> 0,1$ min de ancho de pico y 8 nm de ancho de banda) y una longitud de onda de referencia de 360 nm (100 nm de ancho de banda).

Las muestras de prueba se inyectaron por duplicado. La pureza se determinó por comparación del área del pico de anticuerpo PG110 con el área total de todos los componentes con absorción a 214 nm presentes en la muestra, excluyendo los picos relacionados con la solución amortiguadora. Este método permitió resolver los agregados y fragmentos de anticuerpo de alto peso molecular a partir de PG110 intacto.

Opacidad

Se condujeron ensayos de opacidad para medir el contenido de partículas insolubles en las soluciones de anticuerpo. El equipo de medición de la opacidad (contador de partículas, jeringa modelo, Klotz (Bad Liebenzell, Alemania, serie S20037) se equipó con una campana de flujo laminar (Thermo Electron Corp., Asheville, NC, N° modelo ULT2586-9-A40) para minimizar la contaminación por partículas extrañas durante las mediciones. El análisis de opacidad se efectuó de la siguiente manera. Se colocó una muestra de 3,5 ml en un tubo de fondo redondeado de 5 ml bajo condiciones de flujo laminar. Las mediciones se efectuaron de acuerdo con las especificaciones del proveedor en la modalidad de $n = 3$ (0,8 ml por medición individual), después de un lavado inicial de 0,8 ml.

Calorimetría por barrido diferencial (DSC)

Antes del análisis de DSC, se dializan las proteínas en un sistema de soluciones amortiguadoras adecuado usando casetes Slide-A-Lyzer. Este sistema de soluciones amortiguadoras (fosfato 10 mM, citrato 10 mM) también se usa como referencia/blanco para la medición DSC. El anticuerpo se analiza a razón de 1-2 mg/ml. Se usó un instrumento de DSC automático VP-DSC con celda capilar (Microcal). El desplegamiento de las moléculas se estudia aplicando una velocidad de barrido de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ sobre un rango de temperatura de $25^{\circ}\text{C} - 95^{\circ}\text{C}$. Otros parámetros de medición son: período de

ajuste: 16 seg, tiempo de espera de pre-barrido: 10 min, modalidad de retroalimentación: no.

Inspección visual

La inspección visual de las muestras de proteínas se realizó inspeccionando cuidadosamente la solución de proteínas en el recipiente con la muestra y el colorante sin coadyuvantes. Típicamente, las muestras se inspeccionan contra un fondo oscuro o negro para poder identificar con mayor facilidad la materia particulada visible, la turbidez, la opalescencia o los precipitados de proteínas, así como las partículas y los aglomerados visibles. Los recipientes para muestras que pueden emplearse para la inspección visual pueden variar, y abarcan recipientes como los tubos Falcon translúcidos y transparentes, los recipientes de vidrio, los recipientes/tubos de bajo volumen y los casetes de diálisis [slide-a-lyzer].

Ejemplo 1: Impacto del pH de la solución sobre la estabilidad de las formulaciones de PG110 en estudios de ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento (-80°C/30°C). Se evaluó el comportamiento de congelamiento-descongelamiento del anticuerpo ABT110 a una concentración de proteínas de 1 mg/ml en solución amortiguadora de citrato 10 mM/fosfato 10 mM sometiendo a la solución de proteína a un máximo de 4 ciclos entre el estado congelado y el estado líquido a pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 y pH 8. El congelamiento se efectuó por medio de un congelador de temperatura controlada a -80°C, y el descongelamiento se efectuó por medio de un baño de agua de temperatura controlada a 30°C. Se tomaron muestras después de cada ciclo de congelamiento/descongelamiento (F/T) y se analizaron por SEC. Se colocaron aproximadamente 20 ml de cada solución de PG110 en depósitos de 30 ml de PETG para este experimento. La Tabla 3 provee un resumen de los intervalos de prueba para SEC y la cantidad de ciclos de congelamiento/descongelamiento empleados. La Tabla 4 muestra el efecto del proceso con congelamiento/descongelamiento sobre la cantidad de monómeros de PG110 remanentes y la cantidad de fragmentos y agregados formados en las muestras

formuladas con estos niveles de pH.

Tabla 3: Intervalos de las pruebas: Número de ciclos de congelamiento (-80°C) y descongelamiento (baño de agua a 30°C) evaluados

	Intervalos de las pruebas: Número de ciclos de congelamiento/descongelamiento y requisitos de las muestras para las pruebas	
Temperatura de almacenamiento para la prueba de estrés	T0	4
Estudio de ciclos de -80 °C/30 °C	1	1

Tabla 4: Estabilidad física de PG110 durante ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento determinada por SEC

Monómeros					
ciclos f/t	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
T0	98,53	98,46	98,39	98,11	98,00
T4	96,74	96,46	97,81	97,91	97,55
Agregados					
ciclos f/t	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
T0	1,31	1,41	1,47	1,74	1,85
T4	3,00	3,34	2,00	1,94	2,24
Fragmentos					
ciclos f/t	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
T0	0,15	0,11	0,13	0,14	0,14
T4	0,24	0,18	0,18	0,13	0,19

Los resultados muestran que la cantidad de monómeros de PG110 disminuyó ligeramente durante el proceso repetido de congelamiento/descongelamiento (F/T), sin embargo,

solamente hasta un grado menor y más de un 95% de monómeros intactos permaneció estable en la solución.

Se condujeron experimentos de opacidad para determinar la cantidad de partículas subvisibles formada durante cada paso de congelamiento/descongelamiento. La Tabla 5 provee un resumen de los intervalos de prueba para opacidad y la cantidad de ciclos de congelamiento/descongelamiento empleados. Las Tablas 6 y 7 muestran el efecto del proceso de congelamiento/descongelamiento sobre la cantidad de partículas de tamaño mayor o igual a 1 micrometro/ml y mayor o igual a 10 micrometros, respectivamente.

Tabla 5: Intervalos de las pruebas: Número de ciclos de congelamiento (-80°C) y descongelamiento (baño de agua a 30°C) evaluados

	Intervalos de las pruebas: Número de ciclos de congelamiento/descongelamiento y requisitos de las muestras para las pruebas	
Temperatura de almacenamiento para la prueba de estrés	T0	3
Estudio de ciclos de -80 °C/30 °C	2	2

Tabla 6: Estabilidad física de PG110 durante ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento determinada mediante mediciones de partículas subvisibles con la técnica de opacidad. Partículas de un tamaño mayor o igual a 1 micrón/ml (los datos representan el promedio de dos mediciones)

	0 F/T	Desviación respecto del promedio	1 F/T	Desviación respecto del promedio	2 F/T	Desviación respecto del promedio	3 F/T	Desviación respecto del promedio
Agua/contr ol	15	3,75	30,41	7,5	19,37	4,79	29,37	9,79
pH 4	3605	140	8576	7716	1052	1432	45162	2117

					4			
pH 5	2150	1595	1479 3	1976	2630 2	8870	74402	9673
pH 6	207	4,58	5357 7	6670	3060 1	4386	75999	10809
pH 7	140	19	4193 2	4279	3273 7	50	54267	2828
pH 8	137	1,25	1886 2	2643	2172 5	1407	48981	623

Tabla 7: Estabilidad física de PG110 durante ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento determinada mediante mediciones de partículas subvisibles con la técnica de opacidad. Partículas de un tamaño mayor o igual a 10 micrones/ml (los datos representan el promedio de dos mediciones)

	0 F/T	Desviación respecto del promedio	1 F/T	Desviación respecto del promedio	2 F/T	Desviación respecto del promedio	3 F/T	Desviación respecto del promedio
Agua/control	0	0	2,08	2,08	1,25	0	0,79	0,79
pH 4	55,6 2	16	121	105	1375	147	3142	2789
pH 5	41	31	744	390	9293	5575	20507	14028
pH 6	5,62	0,62	993	253	3823	3,54	8039	1785
pH 7	4,58	0,41	494	49	3932	21	6517	1167
pH 8	4,79	1,45	301	244	4019	216	4063	735

Ejemplo 2: Impacto del pH de la solución sobre la estabilidad fisicoquímica de formulaciones de PG110 durante un almacenamiento acelerado

Los factores más importantes que afectan la estabilidad de la proteína durante un

almacenamiento acelerado/a largo plazo de formulaciones líquidas y liofilizadas de la proteína son el pH de las formulaciones y la temperatura de almacenamiento. Para evaluar el impacto de estos factores, la proteína se expuso a un almacenamiento a corto plazo a temperaturas elevadas durante las etapas de preformulación y formulación del proyecto con el fin de lograr una apreciación rápida en cuanto a la factibilidad de formulación para un almacenamiento a largo plazo a temperaturas menores (por ejemplo, 2-8°C).

Se evaluó la estabilidad al almacenamiento del anticuerpo PG110 en solución (2 mg/ml, solución amortiguadora de citrato 10 mM/fosfato 10 mM) a diversas temperaturas por períodos de tiempo prolongados bajo condiciones de temperatura controlada. Después de períodos de almacenamiento definidos, se tomaron muestras y se evaluó el impacto del tiempo de almacenamiento y la temperatura de almacenamiento sobre la estabilidad de PG110.

Para este estudio de examen y selección del pH, el PG110 se formuló a pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 y pH 8 a una concentración de 2 mg/ml en fosfato 10 mM, citrato 10 mM.

Las muestras se llenaron en viales estériles (aproximadamente 500 µl cada uno) y se guardaron bajo condiciones controladas (en cámaras de temperatura y en ausencia de luz) a 40°C y 50°C. En tiempos predefinidos, se tomaron muestras de soluciones preparadas para su análisis, de acuerdo con el esquema de toma de muestras provisto en la Tabla 8. Los números se refieren a la cantidad de viales almacenadas/tomadas. Los datos resultantes se muestran en la Tabla 9 y la Tabla 10.

Tabla 8: Esquema de toma de muestras

	T0	7 días	6 m	12 m
5°C			1	1
25°C			1	
40°C	1	1		
50°C		1		

Tabla 9: Contenido de monómeros, agregados y fragmentos de muestras de PG110 formuladas a diversos valores de pH después del almacenamiento a largo plazo (datos de SEC) cuando se guardan a 50°C

PG110 almacenado a 50°C						
Monómeros						
Tiempo	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
0	0	96,85	97	97,15	96,93	96,68
7 días	0	9,65	85,54	94,84	93,96	92,2
Agregados						
0	100,00	1,75	1,75	1,62	1,95	2,12
7 días	100,00	86,22	12,41	3,06	4,00	5,19
Fragmentos						
0	0,00	1,39	1,23	1,21	1,10	1,18
7 días	0,00	4,12	2,03	2,08	2,03	2,60

Tabla 10: Contenido de monómeros, agregados y fragmentos de muestras de PG110 formuladas a diversos valores de pH después del almacenamiento a largo plazo (datos de SEC) cuando se guardan a diversas temperaturas

PG110 almacenado a diversas temperaturas						
Monómeros						
Tiempo	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
0	0	96,85	97	97,15	96,93	96,68
7 días, 40C	0	81,64	96,64	96,84	96,1	95,49
6 meses, 25C	0	92,89	94,81	94,32	95,14	89,12
6 meses, 5C	0	97,87	97,86	97,78	97,33	97,10
12 meses, 5C	0	97,50	97,37	97,53	97,11	96,42
Agregados						
0	100	1,75	1,75	1,62	1,95	2,12
7 días, 40C	100	15,32	1,78	1,65	2,56	3,08
6 meses, 25C	100	2,55	2,38	3,02	2,71	2,81
6 meses, 5C	100	1,38	1,56	1,64	1,95	2,22
12 meses, 5C	100	1,40	1,62	1,57	2,04	2,67

Fragmentos						
0	0	1,39	1,23	1,21	1,1	1,18
7 días, 40C	0	3,03	1,57	1,49	1,33	1,42
6 meses, 25C	0	4,55	2,79	2,64	2,14	8,05
6 meses, 5C	0	0,73	0,57	0,56	0,71	0,66
12 meses, 5C	0	1,08	1,00	0,88	0,83	0,90

También se evaluaron los datos del enfoque isoelectrico capilar por imágenes para las muestras de estabilidad acelerada indicadas precedentemente. El icIEF provee información acerca de la estabilidad química de la molécula. Las Tablas 11 y 12 muestran el esquema de toma de muestras y los datos, respectivamente.

Tabla 11: Esquema de toma de muestras

	T0	21 días	4 meses	12 meses
40°C	1	1	1	
25°C			1	
5°C			1	1

Tabla 12: Contenido de las especies principales, ácidas y básicas, de las muestras de PG110 formuladas a diversos valores de pH después del almacenamiento a largo plazo (iCIEF) cuando se guardan a distintas temperaturas. Los resultados también muestran el correspondiente valor de pI de las moléculas.

T0				
Muestra	Ácidos	Principal	Básicos	pI
pH 4,0	33,27	55,38	11,35	7,01
pH 5,0	33,98	56,63	9,39	6,95
pH 6,0	32,57	57,13	10,3	7,01
pH 7,0	31,71	58,72	9,57	7,1
pH 8,0	31,98	59,03	8,99	7,12
40°C, 21 días				
	Ácidos	Principal	Básicos	pI
pH 4,0	24,87	23,81	51,33	6,94

pH 5,0	46,38	44,1	9,53	6,94
pH 6,0	48,31	43,42	8,27	6,94
pH 7,0	56,99	37,06	5,95	6,94
pH 8,0	74,27	19,43	6,3	6,93
5°C, 4 meses				
	Ácidos	Principal	Básicos	pl
pH 4,0	35,50	52,96	11,54	7,02
pH 5,0	33,43	56,73	9,84	7,01
pH 6,0	33,62	57,09	9,30	7,01
pH 7,0	34,56	56,49	8,95	7,01
pH 8,0	37,02	54,31	8,68	7,01
25°C, 4 meses				
	Ácidos	Principal	Básicos	pl
pH 4,0	52,31	29,10	18,59	7,01
pH 5,0	44,39	45,58	10,03	7,02
pH 6,0	43,76	47,81	8,43	7,01
pH 7,0	53,44	40,08	6,48	7,01
pH 8,0	70,80	26,00	3,20	6,99
40°C, 4 meses				
	Ácidos	Principal	Básicos	pl
pH 4,0	19,02	9,62	71,36	6,99
pH 5,0	74,96	7,37	17,68	7,01
pH 6,0	85,28	8,94	5,78	7,01
pH 7,0	95,74	4,26	0,00	6,98
pH 8,0	99,07	0,36	0,57	6,98
5°C, 12 Meses				
	Ácidos	Principal	Básicos	pl
pH 4,0	37,21	52,58	10,21	7,17
pH 5,0	35,45	55,20	9,35	7,16
pH 6,0	34,95	55,48	9,57	7,14
pH 7,0	36,76	54,55	8,69	7,14
pH 8,0	42,54	49,29	8,17	7,12

Estos datos demuestran que un rango de pH de la solución de aproximadamente pH 5-7

mantiene mejor la estabilidad de PG110 a mayores temperaturas. Después de 1 semana de almacenamiento a 40°C y 50°C, los niveles de monómeros eran mayores en las muestras formuladas a pH 6.

PG110 a 2 mg/ml fuera de un rango de pH de 5-7 claramente indujo una pérdida de estabilidad, indicada por niveles incrementados de agregados y fragmentos. Los niveles de fragmentos revelan una degradación mínima en muestras formuladas a un pH de aproximadamente 6. Los datos de icIEF también muestran que un pH de aproximadamente 6 era mejor para mantener la estabilidad de PG110. Estos datos sugieren que un pH de aproximadamente 5,5 - 6,5 conserva mejor la estabilidad de la proteína PG110 bajo las condiciones de estrés específicas aplicadas en este experimento.

Ejemplo 3: Impacto de la formulaciones sobre la estabilidad de las formulaciones de PG110 en estudios de ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento (-80°C/30°C) bajo condiciones de 30 mg/ml.

Se evaluó el comportamiento con congelamiento/descongelamiento (F/T) del anticuerpo ABT110 a una concentración de proteínas de 30 mg/ml en diferentes formulaciones sometiendo la sustancia de prueba a un máximo de 3 ciclos entre el estado congelado y el estado líquido a pH 5,5. Las formulaciones evaluadas son:

- (1) acetato 10 mM + cloruro de sodio 125 mM pH 5,5
- (2) histidina 15 mM, pH 5,5
- (3) histidina 15 mM y Tween 80 0,01%, pH 5,5

El congelamiento se efectuó por medio de un congelador de temperatura controlada a -80°C, y el descongelamiento se efectuó por medio de un baño de agua de temperatura controlada a 30°C. Las muestras se tomaron después de cada ciclo de congelamiento/descongelamiento y fueron analizadas por SEC e inspección visual. Para este experimento se colocó aproximadamente 1 ml de solución de PG110 en los depósitos. La Tabla 13 provee un resumen de los intervalos de prueba para SEC y la cantidad de ciclos de congelamiento/descongelamiento empleados. La Tabla 14 muestra

el efecto del proceso con congelamiento/descongelamiento sobre la cantidad de monómeros de PG110 remanentes y la cantidad de fragmentos y agregados formados en las muestras formuladas con estos niveles de pH.

Tabla 13: Intervalos de las pruebas: Número de ciclos de congelamiento (-80°C) y descongelamiento (baño de agua a 30°C) evaluados

	Intervalos de las pruebas: Número de ciclos de congelamiento/descongelamiento y requisitos de las muestras para las pruebas	
Temperatura de almacenamiento para la prueba de estrés	T0	3
Estudio de ciclos de -80 °C/30 °C	1	1

Tabla 14: Estabilidad física de PG110 durante ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento determinada por SEC

Acetato + NaCl, pH 5,5				
Monómeros	T0	1 F/T	2 F/T	3 F/T
	98,76	98,76	98,76	98,83
Agregados	T0	1 F/T	2 F/T	3 F/T
	1,23	1,23	1,23	1,16
Fragmentos	T0	1 F/T	2 F/T	3 F/T
	0	0	0	0
Histidina 15 mM, pH 5,5				
Monómeros	T0	1 F/T	2 F/T	3 F/T
	98,82	98,82	98,83	98,85
Agregados	T0	1 F/T	2 F/T	3 F/T
	1,17	1,17	1,16	1,14
Fragmentos	T0	1 F/T	2 F/T	3 F/T
	0	0	0	0
Histidina 15 mM, Tween 80 0,01%, pH 5,5				
Monómeros	T0	1 F/T	2 F/T	3 F/T
	98,85	98,85	98,89	98,86
Agregados	T0	1 F/T	2 F/T	3 F/T

	1,14	1,14	1,1	1,13
Fragmentos	T0	1 F/T	2 F/T	3 F/T
	0	0	0	0

A partir de la inspección visual de las diversas formulaciones, se determinó que las formulaciones que contienen histidina y Tween 80 (Polisorbato 80) presentaban una formación mínima de partículas aún después de 3 ciclos de f/t, lo cual indicaba que tanto la histidina como Tween 80 son excipientes muy adecuados para conservar la estabilidad de PG110. Las otras dos formulaciones presentaron una cantidad mucho mayor de partículas visibles (20-30 partículas visibles por recipiente).

Ejemplo 4: Impacto de los parámetros de la formulación sobre la estabilidad de las formulaciones de PG110 durante los estudios de microcalorimetría (estabilidad intrínseca) bajo condiciones de 1 mg/ml.

Se evaluó la estabilidad termodinámica (estabilidad intrínseca) del anticuerpo ABT110 a una concentración de proteínas de 1 mg/ml en diferentes formulaciones usando microcalorimetría. El calentamiento se efectuó a una velocidad de barrido de 1° C/minuto. Los resultados se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15: Temperaturas de transición de fusión bajo diferentes condiciones de formulación.

	Tm1	Tm2	Tm3
Histidina 15 mM, pH 6	58,59	67,25	75,02
Fosfato 15 mM, pH 6	68,3	74,68	77,22
Succinato 15 mM, pH 6	68,4	74,62	77,09
Acetato 10 mM + NaCl 125 mM, pH 5,5	65,5	72,99	76,21
Agua, pH 6	69,82	75,58	77,81
Citrato 10 mM + fosfato 10 mM + Tween 80 0,01%, pH 6	67,8	73,96	76,69
Citrato 10 mM + fosfato 10 mM + manitol 40 mg/ml, pH 6	68,5	74,52	77,2
Citrato 10 mM + fosfato 10 mM + sorbitol 40 mg/ml,	68,9	74,9	77,34

pH 6			
Citrato 10 mM + fosfato 10 mM + sacarosa 40 mg/ml, pH 6	68,75	74,73	77,41
Citrato 10 mM + fosfato 10 mM + trehalosa 80 mg/ml, pH 6	68,9	74,91	77,55
Citrato 10 mM + fosfato 10 mM, pH 4	53,68	62,02	69,68
Citrato 10 mM + fosfato 10 mM, pH 6	67,92	74,41	76,78
Citrato 10 mM + fosfato 10 mM, pH 8	70,56	75,58	77,42

Estos datos muestran que la estabilidad intrínseca de PG110 es afectada por los parámetros de formulación, por ejemplo, el pH de la formulación y los excipientes.

Ejemplo 5: Impacto de la concentración sobre la estabilidad de una formulación de PG110 durante estudios de congelamiento/descongelamiento repetidos (-80°C/30°C) bajo condiciones de 100 mg/ml.

Se evaluó el comportamiento de congelamiento/descongelamiento (F/T) del anticuerpo ABT110 a una concentración de proteínas de 100 mg/ml sometiendo a la solución de proteínas a un máximo de 4 ciclos entre el estado congelado y el estado líquido a pH 6. Los datos previos indican que la histidina es una solución amortiguadora/excipiente adecuado para la estabilización de PG110 y, por consiguiente, se estudió el impacto estabilizante de la histidina sobre la estabilidad de la proteína PG110 a una concentración de proteína de 100 mg/ml.

El congelamiento se efectuó por medio de un congelador de temperatura controlada a -80°C, y el descongelamiento se efectuó por medio de un baño de agua de temperatura controlada a 30°C. Las muestras se tomaron después de cada ciclo de congelamiento/descongelamiento y fueron analizadas por SEC e inspección visual. La Tabla 16 provee un resumen de los intervalos de prueba para SEC y la cantidad de ciclos de congelamiento/descongelamiento empleados. La Tabla 17 muestra el efecto del proceso con congelamiento/descongelamiento sobre la cantidad de monómeros de PG110 remanentes y la cantidad de fragmentos y agregados formados en las muestras

formuladas con estos niveles de pH.

Tabla 16: Intervalos de las pruebas: Número de ciclos de congelamiento (-80°C) y descongelamiento (baño de agua a 30°C) evaluados

	Intervalos de las pruebas: Número de ciclos de congelamiento/descongelamiento y requisitos de las muestras para las pruebas	
Temperatura de almacenamiento para la prueba de estrés	T0	1
Estudio de ciclos de -80 °C/30 °C	T2	2
Estudio de ciclos de -80 °C/30 °C	T4	2

Tabla 17: Estabilidad física de PG110 formulada a una concentración elevada de proteínas (100 mg/ml) en pH 6, histidina 15 mM, durante ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento, determinada por SEC.

Datos de SEC	Muestra	T0	2 F/T	4 F/T
Monómeros	muestra 1	98,0	97,9	97,9
	muestra 2	-	97,9	97,9
Agregados	muestra 1	1,9	1,9	1,9
	muestra 2	-	1,9	1,9
Fragmentos	muestra 1	0,1	0,2	0,2
	muestra 2	-	0,2	0,2

Los datos muestran que a 100 mg/ml, las formulaciones de PG110 no presentaban inestabilidad física durante procesos repetidos de f/t, dado que los niveles de monómeros, agregados y fragmentos prácticamente permanecieron sin cambios durante todo el experimento de f/t, lo cual indica que la histidina es un excipiente muy adecuado para conservar la estabilidad de PG110 durante un proceso de f/t.

Ejemplo 6: Impacto de las soluciones amortiguadoras y los excipientes sobre la turbidez y

la morfología de partículas en las formulaciones de PG110 después de diálisis determinado por inspección visual

La experiencia previa con PG110 ha mostrado que la proteína tiende a presentar inestabilidad física, como lo reflejan los fenómenos de formación y precipitación severas de partículas visibles cuando se guarda en una solución de acetato 10 mM, NaCl 125 mM a pH 5,5. Este experimento fue diseñado para verificar si la formación de partículas visibles es inherente a la propia proteína o si era posible identificar una formulación capaz de conservar la estabilidad física y reducir la susceptibilidad de formación de partículas.

Dado que es posible observar las partículas mencionadas previamente a simple vista, una inspección visual cuidadosa de las soluciones de PG110 formuladas con diferentes excipientes es una manera muy informativa para determinar las condiciones de formulación que permitan acelerar o prevenir la formación de partículas.

Para ello, se prepararon mediante diálisis soluciones de PG110 con los excipientes enumerados en la Tabla 18 y a una concentración de 1 mg/ml.

Tabla 18: Soluciones amortiguadoras y excipientes evaluados por su efecto sobre la formación de partículas visibles de PG110 en solución (la solución amortiguadora universal, o UB6, es fosfato 10 mM, citrato 10 mM, pH 6).

- fosfato de sodio 15 mM
- citrato de sodio 15 mM
- succinato de sodio 15 mM
- arginina 15 mM
- histidina 15 mM
- formulación auto-amortiguada
- solución amortiguadora universal 10 mM y manitol 40 mg/ml
- solución amortiguadora universal 10 mM y sorbitol 40 mg/ml
- solución amortiguadora universal 10 mM y sacarosa 80 mg/ml
- solución amortiguadora universal 10 mM y trehalosa 80 mg/ml

- solución amortiguadora universal 10 mM y Polisorbato 80 0,01% (m/m)
- acetato 10 mM, NaCl 125 mM

Se insertó una solución de PG110 de más de 1 mg/ml en casetes Slide-a-Lyzer con 10.000 MWCO y se dializó contra 1 l de la solución amortiguadora/excipientes blanco durante 1 hora. Posteriormente, se reemplazó el medio de diálisis por medio recién preparado y se continuó con la diálisis durante la noche. Después de la diálisis, se midió la concentración de las soluciones por UV280. Si la concentración era demasiado alta, las soluciones eran diluidas con la correspondiente solución amortiguadora hasta la concentración blanco. Si la concentración era demasiado baja, la solución se concentró usando tubos para centrifuga Amicon Ultra hasta la concentración blanco. A continuación, se comprobó el pH de las soluciones. Si el pH no se encontraba dentro de $\pm 0,1$ de un valor de 6, se ajustaba el pH al valor blanco con NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M. La condición de pH 6 se seleccionó en base a experimentos anteriores que determinaron que era el pH casi óptimo para la estabilidad química y física. Posteriormente, las soluciones se pasaron a través de filtros de 0,20 μm hacia recipientes PETG translúcidas. También se hizo pasar agua destilada a través de los mismos filtros hacia recipientes PETG para que sirviera como control.

Después de este procedimiento, las soluciones de PG110 en los viales PETG eran inspeccionados visualmente por la presencia de partículas. Las botellas se sostuvieron contra una luz fluorescente suave así como contra un fondo negro. Las botellas también se agitaron suavemente para hacer que las partículas fluyeran, con lo cual se facilitaba la inspección visual. Luego se guardaron las botellas a 4°C durante la noche. Al día siguiente, las botellas eran retiradas del almacenamiento e inspeccionadas como se indicó antes.

Una inspección efectuada inmediatamente después de la filtración no reveló presencia de partículas visibles en todas las muestras. Sin embargo, después del almacenamiento durante la noche a 4°C, la inspección visual reveló formación de partícula en muchas de

las soluciones amortiguadoras/excipientes. Los hallazgos se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19: Hallazgos con inspección visual de soluciones de PG110 en las soluciones amortiguadoras/excipientes enumerados. Las soluciones fueron inspeccionadas después de filtración y almacenamiento durante la noche a 4°C. UB6 es citrato 10 mM, fosfato 10 mM, pH 6.

Solución amortiguadora/excipiente	Observación visual
agua	sin partículas
fosfato 15 mM	fibras tipo polvillo
citrato 15 mM	fibras tipo polvillo
succinato 15 mM	muchas fibras tipo polvillo
histidina 15 mM	cantidades traza de fibras tipo polvillo
arginina 15 mM	cantidades traza de fibras tipo polvillo
auto-amortiguadora / solo agua	cantidades traza muy pequeñas de fibras tipo polvillo
UB6 + sorbitol 40 mg/ml	fibras tipo polvillo
UB6 + manitol 40 mg/ml	cantidades traza de fibras tipo polvillo
UB6 + sacarosa 80 mg/ml	fibras tipo polvillo
UB6 + trehalosa 80 mg/ml	fibras tipo polvillo
UB6 + Tween80 0,01%	Translúcido Sin partículas
acetato 10 mM, NaCl 125 mM	muchas fibras tipo polvillo

Los datos indican que Tween-80 previene la formación de partículas visibles, lo cual justifica entonces su uso. Entre los excipientes mencionados con capacidad amortiguadora a pH 6 (citrato, fosfato, succinato, histidina), los datos indican que la histidina es mejor para prevenir la formación de partículas visibles.

Ejemplo 7: Impacto de las soluciones amortiguadoras y de los excipientes de formulación sobre la estabilidad de formulaciones de PG110 durante ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento (-80°C/30°C)

Este ejemplo describe los datos de los experimentos que se condujeron para evaluar el potencial de estabilización de diversas soluciones amortiguadoras y excipientes en

soluciones de formulaciones de PG110 a 2 mg/ml y pH 6 luego de procesos repetidos de congelamiento (congelador de temperatura controlada a -80 °C) y descongelamiento (baño de agua circulante con temperatura controlada a 30°C). La condición de pH 6 se seleccionó en base a experimentos anteriores que determinaron que era el pH casi óptimo para la estabilidad química y física. Las soluciones amortiguadoras y los excipientes evaluados se enumeran en la Tabla 20.

Tabla 20: Soluciones amortiguadoras y excipientes evaluados por su efecto sobre la degradación de PG110 DS cuando son expuestos a congelamiento-descongelamiento (la solución amortiguadora universal, o UB6, es fosfato 10 mM, citrato 10 mM, pH 6).

- fosfato de sodio 15 mM
- citrato de sodio 15 mM
- succinato de sodio 15 mM
- arginina 15 mM
- histidina 15 mM
- formulación de baja fuerza iónica (es decir, formulada en agua)
- solución amortiguadora universal 10 mM y manitol 40 mg/ml
- solución amortiguadora universal 10 mM y sorbitol 40 mg/ml
- solución amortiguadora universal 10 mM y sacarosa 80 mg/ml
- solución amortiguadora universal 10 mM y trehalosa 80 mg/ml
- solución amortiguadora universal 10 mM y Polisorbato 80 0,01% (m/m)
- acetato 10 mM, NaCl 125 mM

Se tomaron muestras a T0, T1 (después de un paso de congelamiento/descongelamiento), T2 y T3. Un paso de proceso de congelamiento-descongelamiento abarcaba almacenamiento de la muestra a -80°C durante al menos 4 horas y el subsiguiente descongelamiento de la muestra en un baño de agua circulante a 30°C. Para analizar las muestras de congelamiento-descongelamiento, se llenaron tubos de fondo redondeado de 5 ml con 3,5 ml de formulación de anticuerpo (usando una punta

de pipeta de 5 ml lavada con WFI filtrado 0,2 μm) y luego fueron sometidas a la medición de la opacidad. Además, se tomaron 0,1 ml de cada muestra para el análisis SEC y se tomaron y guardaron 0,2 ml de la muestra a -80°C (muestra de reserva para una caracterización analítica adicional opcional).

Tabla 21: Esquema de la toma de muestras para los experimentos de congelamiento-descongelamiento

	T0	T1	T2	T3	T4
$-80^{\circ}\text{C}/30^{\circ}\text{C}$	Vial 1	Vial 1	Vial 1	Vial 1	Vial 1
	Vial 2	Vial 2	Vial 2	Vial 2	Vial 2

* Vial indica 30 ml de depósito de PETG lleno de solución de muestra

El efecto de las soluciones amortiguadoras y de los excipientes sobre la formación de partículas subvisibles de tamaño $\square 1 \mu\text{m}$ y $\square 10 \mu\text{m}$ durante el proceso de congelamiento-descongelamiento de PG110 se muestra en las Tablas 22 y 23, respectivamente. Los datos de SEC se muestran en las Tablas 24, 25 y 26.

En algunas formulaciones, tales como las de fosfato, citrato, sorbitol, manitol y sacarosa, la cantidad de partículas $\geq 1 \mu\text{m}/\text{ml}$ aumentaba después del primer ciclo de congelamiento-descongelamiento solamente para disminuir después del segundo ciclo. En otras formulaciones, tales como las que contienen histidina, arginina o simplemente agua, la cantidad de partículas $\geq 1 \mu\text{m}/\text{ml}$ aumentaba después de cada ciclo de congelamiento-descongelamiento. Las partículas $\geq 10 \mu\text{m}/\text{ml}$ aumentaban después de cada ciclo de congelamiento-descongelamiento para las formulaciones con fosfato, citrato, succinato, histidina, arginina y simplemente agua. Para las formulaciones con sorbitol, manitol o sacarosa, las partículas $\geq 10 \mu\text{m}/\text{ml}$ aumentaban después del primer ciclo de congelamiento-descongelamiento, pero disminuyeron con los ciclos subsiguientes. Después de un ciclo de congelamiento-descongelamiento, las formulaciones con sorbitol o manitol presentaban la mayor cantidad de partículas $\geq 1 \mu\text{m}/\text{ml}$ (al menos $> \sim 200.000$) y también $\geq 10 \mu\text{m}/\text{ml}$ (~ 25000 en promedio). Sin embargo, después del tercer ciclo de

congelamiento-descongelamiento, todas las formulaciones revelaron partículas $\geq 1 \mu\text{m/ml}$ a razón de menos que 100.000 por ml.

Se encontró que el Polisorbato 80 tenía un efecto positivo con respecto al mantenimiento de la estabilidad de PG110, ya que prevenía la formación de partículas subvisibles durante el proceso de congelamiento-descongelamiento de PG110. Esto se atribuye a la capacidad del Polisorbato 80 de prevenir la desnaturalización del anticuerpo en la interfase de hielo-agua. Se encontró que los azúcares/alcoholes de azúcar, incluyendo manitol, sorbitol y sacarosa, inducen formación de partículas subvisibles después de ciclos tempranos de congelamiento-descongelamiento. Estas observaciones están sustentadas por los datos de SEC que muestran una pérdida notable en el % de monómeros y un correspondiente incremento en el % de agregados para las formulaciones con manitol y sorbitol. (Para los demás excipientes, los datos de SEC no difieren en términos de estabilidad.)

Tabla 22: Cantidad de partículas $\geq 1 \mu\text{m/ml}$ medida después de los ciclos de congelamiento-descongelamiento indicados. F/T0 se encuentra por debajo de congelamiento. UB6 es fosfato 10 mM, citrato 10 mM, pH 6.. El agua es agua pura sin proteína.

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
	N° $\geq 1 \mu\text{m}$		N° $\geq 1 \mu\text{m}$		N° $\geq 1 \mu\text{m}$		N° $\geq 1 \mu\text{m}$	
Solución amortiguadora	prom	de	prom	de	prom	de	prom	de
fosfato	536,67	94,58	17274,58	6372,51	9415,42	2353,78	9014,58	512,36
citrato	723,75	174,13	40620,83	795,79	27191,25	10421,87	10470,21	7553,08
succinato	1147,29	571,58	20720,21	2263,33	19527,29	8585,45	9504,17	1297,25
histidina	250,21	42,43	1647,08	617,25	8963,33	4741,45	21077,50	12656,92

arginina	690,6 3	557, 44	2407,29	122,57	5858,5 4	2044,1 3	8314,1 7	6856,2 8
auto-amort/agua	410,2 1	23,5 7	1622,50	811,11	8722,5 0	4459,1 9	21048, 75	9602,8 0
UB6 + sorbitol	1049, 58	421, 61	260052, 29	31476, 86	74827, 29	21027, 59	15613, 54	10,02
UB6 + manitol	1113, 33	260, 75	209047, 71	40784, 74	78368, 54	9137,5 9	26725, 21	4711,1 0
UB6 + sacarosa	1330, 00	169, 41	43803,3 3	970,80	11592, 08	408,65	7183,3 3	1182,3 4
UB6 + trehalosa	1320, 63	306, 41	9674,17	1445,1 5	15516, 25	1373,2 6	9259,1 7	7457,9 1
UB6 + Tween 80	11,04	7,66	671,67	707,40	185,83	219,50	231,46	139,65
Acetato 10 mM/NaCl 125 mM	954,5 8	231, 28	17396,6 7	617,83	14698, 13	1752,4 5	10400, 00	4,42
Agua	18,96		14,79		39,38		49,38	

Tabla 23: Cantidad de partículas $\geq 10 \mu\text{m/ml}$ medida después de los ciclos de congelamiento-descongelamiento indicados. F/T0 se encuentra por debajo de congelamiento. UB6 es fosfato 10 mM, citrato 10 mM, pH 6. El agua es agua pura sin proteínas, de baja fuerza iónica significa que la proteína está formulada en agua sin agregado de excipientes adicionales.

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
	N° $\geq 10 \mu\text{m}$		N° $\geq 10 \mu\text{m}$		N° $\geq 10 \mu\text{m}$		N° $\geq 10 \mu\text{m}$	
Solución amortiguadora	prom	de	prom	de	prom	de	prom	de
Fosfato	18,54	6,19	248,33	55,68	574,79	435,17	1224,3 8	408,94
citrato	26,67	12,3 7	533,96	383,61	968,75	192,10	899,17	217,14

succinato	138,33	128,46	359,38	149,67	908,75	207,42	1920,21	121,98
histidina	36,25	22,98	73,33	58,04	4456,88	3766,82	6125,21	3906,76
arginina	167,29	213,61	59,79	43,02	1113,33	500,28	2978,54	3415,92
baja fuerza iónica	22,71	5,01	18,54	12,37	1871,88	2062,10	3028,33	2162,86
UB6 + sorbitol	47,50	16,50	33930,83	12385,27	8329,79	2310,77	3302,50	1157,00
UB6 + manitol	41,25	4,12	16219,17	18940,15	7868,13	1498,18	1774,17	969,03
UB6 + sacarosa	43,33	1,77	3577,29	2615,12	2069,58	991,72	1427,92	1182,34
UB6 + trehalosa	27,71	4,42	173,75	82,79	1866,04	27,99	379,17	310,24
UB6 + Tween 80	5,42	3,54	370,63	497,92	11,04	5,01	17,50	18,56
Acetato 10 mM/NaCl 125 mM	124,79	78,08	241,67	16,20	584,38	93,40	930,21	390,68
Agua	2,08		1,04		0,00		1,04	

Tabla 24: Porcentaje de monómeros de muestras de PG110 formuladas en diversas soluciones amortiguadoras y excipientes después de los experimentos de almacenamiento con congelamiento/descongelamiento (datos de SEC) (UB6 es citrato 10 mM, fosfato 10 mM, pH 6; “amort” es la proteína en agua solamente).

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
Solución amortiguadora	prom	de	prom	de	prom	de	prom	de
fosfato	98,34	0,04	98,27	0,02	98,43	0,05	98,35	0,06
citrato	98,42	0,03	98,04	0,36	98,43	0,05	98,33	0,11
succinato	98,37	0,00	98,29	0,02	98,36	0,06	98,32	0,08

histidina	98,38	0,04	98,30	0,00	98,48	0,00	98,40	0,05
arginina	98,40	0,02	98,28	0,01	98,52	0,05	98,44	0,04
baja fuerza iónica	98,47	0,02	98,37	0,01	98,47	0,02	98,35	0,02
UB6 + sorbitol	98,40	0,04	97,87	0,05	98,04	0,04	98,05	0,03
UB6 + manitol	98,41	0,00	97,34	0,07	97,47	0,02	97,43	0,09
UB6 + sacarosa	98,40	0,02	98,35	0,01	98,60	0,01	98,57	0,01
UB6 + trehalosa	98,37	0,06	98,36	0,01	98,58	0,01	98,58	0,04
UB6 + Tween 80	98,23	0,04	98,26	0,04	98,55	0,02	98,57	0,02
Acetato 10 mM/NaCl 125 mM	98,37	0,02	98,21	0,04	98,31	0,04	98,24	

Tabla 25: Porcentaje de agregados de muestras de PG110 formuladas en diversas soluciones amortiguadoras y excipientes después de experimentos de almacenamiento con congelamiento/descongelamiento (datos de SEC) (UB6 es citrato 10 mM, fosfato 10 mM, pH 6; baja fuerza iónica significa que la proteína está formulada en agua sin agregado de excipientes adicionales.)

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
Solución amortiguadora	prom	de	prom	de	prom	de	prom	de
fosfato	1,49	0,02	1,56	0,02	1,36	0,03	1,41	0,05
citrato	1,44	0,03	1,81	0,34	1,41	0,05	1,48	0,09
succinato	1,48	0,01	1,55	0,02	1,42	0,06	1,43	0,07
histidina	1,46	0,03	1,52	0,00	1,30	0,01	1,32	0,04
arginina	1,44	0,02	1,54	0,00	1,27	0,04	1,29	0,03
baja fuerza iónica	1,37	0,00	1,45	0,01	1,29	0,02	1,36	0,01
UB6 + sorbitol	1,47	0,04	1,98	0,04	1,77	0,04	1,74	0,03
UB6 + manitol	1,45	0,00	2,50	0,05	2,33	0,03	2,37	0,09
UB6 + sacarosa	1,46	0,01	1,48	0,01	1,23	0,01	1,23	0,02

UB6 + trehalosa	1,48	0,06	1,48	0,01	1,22	0,01	1,22	0,03
UB6 + Tween 80	1,61	0,04	1,56	0,04	1,24	0,00	1,21	0,01
Acetato 10 mM/NaCl 125 mM	1,46	0,02	1,60	0,04	1,44	0,04	1,49	

Tabla 26: Porcentaje de fragmentos de muestras de PG110 formuladas en diversas soluciones amortiguadoras y excipientes después de experimentos de almacenamiento con congelamiento/descongelamiento (datos de SEC) (UB6 es citrato 10 mM, fosfato 10 mM, pH 6; baja fuerza iónica significa que la proteína está formulada en agua sin agregado de excipientes adicionales.)

	F/T 0		F/T 1		F/T 2		F/T 3	
Solución amortiguadora	prom	de	prom	de	prom	de	prom	de
fosfato	0,17	0,02	0,18	0,00	0,20	0,03	0,24	0,01
citrato	0,14	0,00	0,15	0,02	0,17	0,00	0,20	0,01
succinato	0,15	0,00	0,16	0,00	0,22	0,00	0,25	0,01
histidina	0,15	0,02	0,18	0,00	0,21	0,00	0,28	0,01
arginina	0,15	0,00	0,18	0,00	0,20	0,01	0,27	0,01
baja fuerza iónica	0,16	0,02	0,18	0,00	0,24	0,01	0,28	0,01
UB6 + sorbitol	0,14	0,00	0,15	0,00	0,19	0,00	0,21	0,00
UB6 + manitol	0,13	0,01	0,16	0,01	0,20	0,01	0,20	0,00
UB6 + sacarosa	0,15	0,01	0,16	0,00	0,18	0,00	0,20	0,01
UB6 + trehalosa	0,14	0,00	0,16	0,01	0,19	0,00	0,20	0,01
UB6 + Tween 80	0,16	0,00	0,18	0,00	0,21	0,01	0,23	0,01
Acetato 10 mM/NaCl 125	0,17	0,00	0,19	0,00	0,25	0,00	0,27	

mM								
----	--	--	--	--	--	--	--	--

Ejemplo 8: Impacto de las soluciones amortiguadoras y de los excipientes sobre la estabilidad fisicoquímica de formulaciones de PG110 durante las pruebas de estabilidad acelerada

En ejemplos anteriores se han descrito los factores que afectan la estabilidad de las formulaciones de PG110 durante el almacenamiento a largo plazo, incluyendo el pH y la temperatura de almacenamiento. Además de estos factores extrínsecos, los propios ingredientes de formulación deben ser evaluados por su impacto sobre la estabilidad de la droga proteica durante el almacenamiento. Para ello, la droga proteica se expuso a un almacenamiento a corto plazo a temperaturas elevadas durante las etapas de preformulación y formulación del proyecto con el fin de lograr una apreciación rápida en cuanto a la factibilidad de formulación para un almacenamiento a largo plazo a temperaturas menores (en la mayoría de los casos, 2-8°C).

Se evaluó la estabilidad al almacenamiento del anticuerpo PG110 en solución a diversas temperaturas por períodos de tiempo prolongados bajo condiciones de temperatura controlada a pH 6 en distintas soluciones amortiguadoras y excipientes. La condición de pH 6 se seleccionó en base a experimentos anteriores que determinaron que era el pH casi óptimo para la estabilidad química y física. Después de períodos de almacenamiento definidos, se tomaron muestras y se evaluó el impacto del tiempo de almacenamiento y la temperatura de almacenamiento sobre la estabilidad de PG110 por SEC e iCIEF.

En este estudio, el PG110 se formuló a razón de 2 mg/ml en las diversas soluciones amortiguadoras y excipientes que se enumeran en la Tabla 27.

Tabla 27. Soluciones amortiguadoras y excipientes evaluados por su efecto sobre la estabilidad física y química de PG110 sometido a almacenamiento a temperaturas elevadas (la solución amortiguadora universal es citrato 10 mM, fosfato 10 mM, pH 6)

- fosfato de sodio 15 mM

- citrato de sodio 15 mM
- succinato de sodio 15 mM
- acetato de sodio 15 mM
- arginina 15 mM
- histidina 15 mM
- Formulaci3n de baja fuerza i3nica
- soluci3n amortiguadora universal 10 mM y manitol 40 mg/ml
- soluci3n amortiguadora universal 10 mM y sorbitol 40 mg/ml
- soluci3n amortiguadora universal 10 mM y sacarosa 80 mg/ml
- soluci3n amortiguadora universal 10 mM y trehalosa 80 mg/ml
- soluci3n amortiguadora universal 10 mM y glicerol 2,5% (m/m)
- soluci3n amortiguadora universal 10 mM y sulfato de amonio 15 mM
- soluci3n amortiguadora universal 10 mM y cloruro de sodio 20 mM
- soluci3n amortiguadora universal 10 mM y cloruro de sodio 200 mM
- soluci3n amortiguadora universal 10 mM y Polisorbato 80 0,01% (m/m)
- soluci3n amortiguadora universal 10 mM y Polisorbato 20 0,01% (m/m)
- soluci3n amortiguadora universal 10 mM y Polox3mero 188 0,1% (m/m)

Las muestras se guardaron luego bajo condiciones controladas (en c3maras de temperatura y en ausencia de luz) a distintas temperaturas. En tiempo predefinidos, se tomaron muestras de las soluciones preparadas para su an3lisis de acuerdo con el esquema de toma de muestras provisto en las Tablas 28 y 29 para SEC e iCIEF, respectivamente. Los n3meros se refieren a la cantidad de viales almacenadas/tomadas para cada condici3n de soluci3n amortiguadora o excipiente. Los datos se proveen en las Tablas 30, 31 y 32.

Tabla 28: Esquema de toma de muestras

	T0	7 d3as	6	12
--	----	--------	---	----

			meses	meses
5°C				1
25°C			1	
40°C	1	1		
50°C		1		

Tabla 29: Esquema de toma de muestras

	T0	4 meses	12 meses
5°C		1	1
25°C		1	
40°C	1	1	

Tabla 30: Porcentaje de monómeros de muestras de PG110 formuladas en diversas soluciones amortiguadoras y excipientes después del almacenamiento a temperaturas y tiempos específicos (datos de SEC) (UB6 es citrato 10 mM, fosfato 10 mM, pH 6; baja fuerza iónica significa que la proteína está formulada en agua sin agregado de excipientes adicionales).

Solución amortiguadora	T0	T7d, 50°C	T7d, 40°C	6 meses, 25°C	12 meses, 5°C
fosfato 15 mM	98,38	93,84	97,92	94,73	93,84
acetato 15 mM	98,45	94,19	97,92	95,41	97,46
citrato 15 mM	98,35	93,92	98,03	95,35	97,49
succinato 15 mM	98,44	94,08	98,08	95,08	97,4
histidina 15 mM	98,58	94,25	98,2	95,29	97,59
arginina 15 mM	98,5	93,17	98,16	96,37	97,79
baja fuerza iónica	98,85	95,88	98,69	96,37	98,02
UB6 + sorbitol 4%	98,16	94,86	98,11	95,5	97,4
UB6 + manitol 4%	98,05	94,91	98,05	95,34	97,45
UB6 + sacarosa 8%	98,52	95,08	98,09	95,77	97,5
UB6 + trehalosa 8%	98,45	94,96	98,06	95,33	97,3
UB6 + Tween 80 0,01%	98,43	93,98	97,88	92,78	96,76

UB6 + glicerol 2,5%	98,53	-----	97,74	95,2	97,24
UB6 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 15 mM	98,35	94,79	98,07	95,17	97,26
UB6 + NaCl 20 mM	98,39	94,42	98	95,26	97,26
UB6 + NaCl 200 mM	98,4	94,58	98,12	95,04	97,04
UB6 + Tween 20 0,01%	98,42	94,08	97,84	94,66	97,23
UB6 + Poloxámero 0,1%	98,47	94,54	97,98	95,07	97,16

Tabla 31: Porcentaje de agregados de muestras de PG110 formuladas en diversas soluciones amortiguadoras y excipientes después del almacenamiento a temperaturas y tiempos específicos (datos de SEC) (UB6 es citrato 10 mM, fosfato 10 mM, pH 6; baja fuerza iónica significa que la proteína está formulada en agua sin agregado de excipientes adicionales).

Solución amortiguadora	T0	T7d, 50°C	T7d, 40°C	6 meses, 25°C	12 meses, 5°C
fosfato 15 mM	1,42	3,45	1,87	2,77	5,22
acetato 15 mM	1,34	3,47	1,88	2,32	1,65
citrato 15 mM	1,48	3,47	1,78	2,34	1,6
succinato 15 mM	1,35	3,31	1,73	2,61	1,66
histidina 15 mM	1,22	3,51	1,6	2,29	1,5
arginina 15 mM	1,3	4,54	1,63	1,73	1,39
baja fuerza iónica	0,95	1,53	1,07	1,61	1,01
UB6 + sorbitol 4%	1,67	3,13	1,71	2,16	1,63
UB6 + manitol 4%	1,77	2,91	1,76	2,28	1,63
UB6 + sacarosa 8%	1,31	2,76	1,73	1,98	1,59
UB6 + trehalosa 8%	1,37	3	1,75	2,4	1,65
UB6 + Tween 80 0,01%	1,38	3,55	1,93	4,75	1,88
UB6 + glicerol 2,5%	1,29	-----	2,04	2,42	1,69
UB6 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 15 mM	1,49	3,22	1,74	2,44	1,68

UB6 + NaCl 20 mM	1,43	3,33	1,81	2,26	1,63
UB6 + NaCl 200 mM	1,42	3,28	1,69	2,47	1,93
UB6 + Tween 20 0,01%	1,39	3,81	1,95	2,78	1,82
UB6 + Poloxámero 0,1%	1,34	3,32	1,83	2,49	1,76

Tabla 32: Porcentaje de fragmentos de muestras de PG110 formuladas en diversas soluciones amortiguadoras y excipientes después del almacenamiento a temperaturas y tiempos específicos (datos de SEC) (UB6 es citrato 10 mM, fosfato 10 mM, pH 6; baja fuerza iónica significa que la proteína está formulada en agua sin agregado de excipientes adicionales).

Solución amortiguadora	T0	T7d, 50°C	T7d, 40°C	6 meses, 25°C	12 meses, 5°C
fosfato 15 mM	0,20	2,71	0,2	2,49	0,93
acetato 15 mM	0,21	2,34	0,20	2,25	0,88
citrato 15 mM	0,17	2,61	0,19	2,29	0,9
succinato 15 mM	0,21	2,61	0,19	2,29	0,93
histidina 15 mM	0,19	2,25	0,19	2,41	0,90
arginina 15 mM	0,20	2,28	0,21	1,89	0,81
baja fuerza iónica	0,20	2,59	0,24	2,52	0,95
UB6 + sorbitol 4%	0,17	2,01	0,18	2,33	0,96
UB6 + manitol 4%	0,18	2,18	0,19	2,36	0,91
UB6 + sacarosa 8%	0,17	2,16	0,19	2,23	0,89
UB6 + trehalosa 8%	0,18	2,04	0,19	2,25	1,04
UB6 + Tween 80 0,01%	0,19	2,46	0,20	2,45	1,34
UB6 + glicerol 2,5%	0,18	-----	0,21	2,36	1,06
UB6 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 15 mM	0,17	2	0,19	2,37	1,05
UB6 + NaCl 20 mM	0,17	2,25	0,19	2,46	1,09
UB6 + NaCl 200 mM	0,18	2,15	0,19	2,47	1,02
UB6 + Tween 20	0,19	2,11	0,20	2,54	0,94

0,01%					
UB6 + Poloxámero 0,1%	0,18	2,14	0,19	2,42	1,07

Tabla 33: Porcentaje de diversas especies de muestras de PG110 formuladas en distintas soluciones amortiguadoras y excipientes después del almacenamiento a temperaturas y tiempos específicos (datos de iCIEF) (UB6 es citrato 10 mM, fosfato 10 mM, pH 6; baja fuerza iónica significa que la proteína está formulada en agua sin agregado de excipientes adicionales).

4 meses, distintas temperaturas		% área			
Solución amortiguadora		Ácidos	Principa	Básicos	pI
Fosfato 15 mM	5 °C	33,74	57,22	9,05	6,94
	25 °C	43,27	48,69	8,04	6,93
	40 °C	86,30	8,26	5,44	6,91
Acetato 15 mM	5 °C	33,59	57,03	9,39	6,93
	25 °C	43,25	48,71	8,04	6,93
	40 °C	86,02	10,89	3,09	6,91
Citrato 15 mM	5 °C	33,05	57,54	9,41	6,96
	25 °C	41,94	50,06	8,00	6,94
	40 °C	85,38	11,27	3,35	6,93
Succinato 15 mM	5 °C	32,62	58,43	8,95	6,96
	25 °C	41,29	50,55	8,16	6,96
	40 °C	83,17	13,98	2,85	6,94
Histidina 15 mM	5 °C	32,79	57,99	9,22	6,99
	25 °C	37,97	52,85	9,18	6,99
	40 °C	70,99	21,43	7,59	6,98
Arginina 15 mM	5 °C	31,47	55,43	13,11	6,82
	25 °C	39,09	49,00	11,91	6,80
	40 °C	92,62	5,66	1,72	6,85
baja fuerza iónica	5 °C	33,48	57,45	9,07	7,00
	25 °C	39,22	51,41	9,37	7,00

	40 °C	74,02	19,15	6,83	6,99
UB6 + Sorbitol 4%	5 °C	32,63	58,32	9,05	6,92
	25 °C	42,57	49,25	8,18	6,92
	40 °C	93,73	2,96	3,31	6,92
UB6 + Manitol 4%	5 °C	33,92	56,96	9,13	6,93
	25 °C	46,64	45,87	7,49	6,92
	40 °C	88,15	9,80	2,05	6,89
UB6 + Sacarosa 8%	5 °C	33,19	57,64	9,17	6,90
	25 °C	43,62	48,52	7,86	6,88
	40 °C	87,02	11,04	1,94	6,85
UB6 + Trehalosa 8%	5 °C	34,44	56,30	9,26	6,94
	25 °C	48,41	44,27	7,33	6,93
	40 °C	89,82	6,74	3,44	6,89
UB6 + Tween 80 0,01%	5 °C	36,81	54,24	8,95	6,94
	25 °C	90,56	7,36	2,08	6,93
	40 °C	100,00	0,00	0,00	ND
UB6 + glicerol 2,5%	5 °C	33,21	57,40	9,39	6,95
	25 °C	41,22	50,31	8,47	6,94
	40 °C	81,69	13,58	4,73	6,92
UB6 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 15 mM	5 °C	33,10	57,65	9,25	6,93
	25 °C	42,47	49,07	8,46	6,92
	40 °C	84,46	12,13	3,41	6,89
UB6 + NaCl 20 mM	5 °C	41,19	48,50	10,31	6,81
	25 °C	47,99	42,16	9,85	6,79
	40 °C	84,56	12,51	2,93	6,77
UB6 + NaCl 200 mM	5 °C	33,13	58,03	8,84	6,92
	25 °C	43,32	48,12	8,56	6,92
	40 °C	84,26	10,55	5,19	6,91
UB6 + Tween 20 0,01%	5 °C	33,71	57,18	9,11	6,93
	25 °C	43,57	48,18	8,25	6,93
	40 °C	84,79	12,37	2,84	6,90
UB6 + Poloxámero 0,1%	5 °C	34,02	56,77	9,21	6,93
	25 °C	42,82	49,11	8,07	6,93
	40 °C	84,80	12,90	2,30	6,90

12 meses, 5°C					
solución amortiguadora		Ácidos	Principa	Básicos	Valor pl
fosfato 15 mM	5 °C	38,194	53,23	8,576	7,12
acetato 15 mM	5 °C	38,226	53,21	8,564	7,09
citrato 15 mM	5 °C	37,955	53,81	8,235	7,14
succinato 15 mM	5 °C	37,633	53,88	8,487	7,16
histidina 15 mM	5 °C	36,612	54,71	8,678	7,13
arginina 15 mM	5 °C	36,923	52,25	10,827	6,99
baja fuerza iónica	5 °C	36,949	54,71	8,341	7,23
UB6 + sorbitol 4%	5 °C	38,342	53,06	8,598	7,11
UB6 + manitol 4%	5 °C	39,883	51,58	8,537	7,11
UB6 + sacarosa 8%	5 °C	38,023	53,11	8,867	7,09
UB6 + trehalosa 8%	5 °C	38,92	52,75	8,33	7,11
UB6 + Tween 80 0,01%	5 °C	48,371	44,8	6,829	7,12
UB6 + glicerol 2,5%	5 °C	37,078	54,34	8,582	7,12
UB6 + (NH ₄) ₂ SO ₄ 15 mM	5 °C	38,121	53,54	8,339	7,08
UB6 + NaCl 20 mM	5 °C	42,232	49,73	8,038	6,9
UB6 + NaCl 200 mM	5 °C	38,253	53,45	8,297	7,14
UB6 + Tween 20 0,01%	5 °C	37,619	53,97	8,411	7,14
UB6 + Poloxámero 0,1%	5 °C	38,145	53,13	8,725	7,15

La estabilidad de PG110 disminuyó con el incremento de la temperatura de almacenamiento lo cual constituye un comportamiento esperado para todas las proteínas. Sin embargo, los datos recolectados hasta el momento indican que la formulación de PG110 usando fosfato, arginina o glicerol daría como resultado una potencial desnaturalización. Después del almacenamiento a 50 °C por 7 días con glicerol, no se detectó ninguna proteína por SEC, lo cual indicaría que todo el PG110 ha sufrido inestabilidad física y formado agregados insolubles, evitando así su detección por SEC/UV.

Ejemplo 9: Impacto de las soluciones amortiguadoras y de los excipientes de formulación sobre la estabilidad de formulaciones de PG110 almacenadas a -80°C

Los hallazgos de los ejemplos anteriores condujo a la decisión que una formulación de histidina 15 mM y Tween 80 0,01% era óptima para la prevención de la formación de partículas visibles en formulaciones líquidas de la droga (Ejemplo 6). Tween 80 también impidió la formación de partículas subvisibles inducida por el estrés debido congelamiento-descongelamiento según se detalló en el Ejemplo 7. Las pruebas de estabilidad acelerada (Ejemplo 8) también determinaron que los dos excipientes no causaron niveles inaceptables de agregación o fragmentación.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, la siguiente preocupación es si los excipientes causan destabilización de la droga cuando se guardan a -80°C. Para evaluarlo, se prepararon 150 µl de soluciones de PG110 a 1 mg/ml y 10 mg/ml en la formulación original (acetato 10 mM, NaCl 125 mM), histidina 15 mM, pH 6, e histidina 15 mM, pH 6 + Tween 80 0,01% y se guardaron a -80°C en crioviales. A los 5 días, se retiraron los viales de cada muestra del almacenamiento y se cuantificó por SEC la degradación fisicoquímica. A los 10 días, se retiraron los viales remanentes de cada muestra y se analizaron de la misma manera. Las Tablas 34, 35 y 36 contienen los resultados de estos experimentos.

Los datos muestran que para las formulaciones con histidina o histidina + Tween 80, el % de monómero aumenta entre los 0 y 5 días y permanecen en dicho nivel a menos hasta los 10 días. Por el contrario, PG110 a 10 mg/ml en acetato 10 mM y NaCl 125 mM muestra una disminución constante en el % de monómeros entre los 0 y 5 días hasta los 10 días lo cual corresponde a un incremento en el % de agregados. En general, los datos indican que una formulación de histidina + Tween 80 no desestabiliza la droga cuando se guarda a -80°C.

Tabla 34. Porcentaje de monómeros de las muestras de PG110 formuladas en diversas soluciones amortiguadoras y excipientes después de su almacenamiento a -80°C (datos de SEC).

Solución amortiguadora	T0	T5d, - 80°C		T10d, -80°C	
	pro m	pro m	de	pro m	de
1 mg/ml acetato 10 mM, NaCl 125 mM	98,2 4	98,3 1	0,0 1	98,3 8	0,02
10 mg/ml acetato 10 mM, NaCl 125 mM	98,2 4	97,9 9	0,0 1	97,7 7	0,02
histidina 1 mg/ml, pH 6	98,2 2	98,3 8	0,0 7	98,4 2	0,03
histidina 10 mg/ml, pH 6	98,2 2	98,4 7	0,0 1	98,4 4	0,02
histidina 1 mg/ml, pH 6 + Tween80 0,01%	98,1 6	98,4 3	0,0 1	98,3 8	0,02
histidina 10 mg/ml, pH 6 + Tween80 0,01%	98,1 6	98,4 5	0,0 1	98,4 3	0,01

Tabla 35. Porcentaje de agregados de las muestras de PG110 formuladas en diversas soluciones amortiguadoras y excipientes después de su almacenamiento a -80°C (datos de SEC).

Solución amortiguadora	T0	T5d, - 80°C		T10d, - 80°C	
	pro m	pro m	de	pro m	de
1 mg/ml acetato 10 mM, NaCl 125 mM	1,5 8	1,5 0	0,0 1	1,3 3	0,0 0
10 mg/ml acetato 10 mM, NaCl 125 mM	1,5 8	1,8 1	0,0 1	1,9 2	0,0 2
histidina 1 mg/ml, pH 6	1,5 9	1,4 2	0,0 6	1,2 9	0,0 1
histidina 10 mg/ml, pH 6	1,5 9	1,3 3	0,0 0	1,2 8	0,0 1
histidina 1 mg/ml, pH 6 + Tween80 0,01%	1,6 5	1,3 5	0,0 1	1,3 1	0,0 0

histidina 10 mg/ml, pH 6 + Tween80 0,01%	1,6 5	1,3 3	0,0 0	1,2 4	0,0 0
---	----------	----------	----------	----------	----------

Tabla 36. Porcentaje de fragmentos de las muestras de PG110 formuladas en diversas soluciones amortiguadoras y excipientes después de su almacenamiento a -80°C (datos de SEC).

Solución amortiguadora	T0	T5d, - 80°C		T10d, - 80°C	
	pro m	pro m	de	pro m	de
1 mg/ml acetato 10 mM, NaCl 125 mM	0,1 8	0,1 9	0,0 0	0,2 9	0,0 2
10 mg/ml acetato 10 mM, NaCl 125 mM	0,1 8	0,2 0	0,0 0	0,3 1	0,0 0
histidina 1 mg/ml, pH 6	0,1 9	0,1 9	0,0 1	0,3 0	0,0 2
histidina 10 mg/ml, pH 6	0,1 9	0,1 9	0,0 1	0,2 9	0,0 1
histidina 1 mg/ml, pH 6 + Tween80 0,01%	0,1 9	0,2 2	0,0 0	0,3 2	0,0 2
histidina 10 mg/ml, pH 6 + Tween80 0,01%	0,1 9	0,2 1	0,0 1	0,3 4	0,0 1

Los datos de inspección visual también mostraron que las formulaciones que contienen histidina aún a 100 mg/ml no presentaban formación de partículas visibles aún después de 4 ciclos de f/t, lo cual es indicativo además que la histidina es un excipiente muy adecuado para conservar la estabilidad PG110.

Ejemplo 10: Impacto de las pruebas de congelamiento-descongelamiento, de agitación y de estabilidad acelerada sobre la estabilidad de PG110 en diversas formulaciones a distintas concentraciones.

El impacto de los excipientes sobre la estabilidad de PG110 se evaluó en diversos

experimentos de estrés:

- 1) procesos repetidos de congelamiento-descongelamiento (-80°C/30°C, baño de agua);
- 2) agitación para provocar eficazmente estrés por agitación y para incrementar la interfase de aire-líquido para inducir inestabilidad física y degradación de PG110 (vial de vidrio 6R, temperatura ambiente, barra de agitación recubierta con aproximadamente 9 mm de Teflon, 550 rpm, hasta 48 hs de agitación);
- 3) Pruebas de estabilidad acelerada: se sometieron varias muestras a estabilidad en tiempo real y acelerada a 2-5 °C, 25 °C/60% de H rel. y 40 °C/60% de H rel., y se monitoreó por SEC/UV el impacto de la concentración de proteínas y excipientes estabilizantes sobre el contenido de monómero nativo de PG110.

Se evaluaron las siguientes formulaciones de PG110 y composiciones de formulación:

Formulación 1: PG110 52 mg/ml, pH 6,0;

Histidina 2,33 mg/ml;

Sacarosa 5,0 mg/ml;

Manitol 20,0 mg/ml; y

Polisorbato 80 0,10 mg/ml.

Formulación 2: PG110 52 mg/ml, pH 6,0;

Histidina 2,33 mg/ml;

Sacarosa 46 mg/ml;

Polisorbato 80 0,10 mg/ml.

Formulación 3: PG110 52 mg/ml, pH 6,0;

Histidina 2,33 mg/ml;

Trehalosa 46 mg/ml; y

Polisorbato 80 0,10 mg/ml.

Formulación 4: PG110 20 mg/ml, pH 6,0;

Histidina 2,33 mg/ml;

Sacarosa 5,0 mg/ml;

Manitol 20,0 mg/ml; y

Polisorbato 80 0,10 mg/ml.

Formulación 5: PG110 20 mg/ml, pH 6,0;

Histidina 2,33 mg/ml;

Sacarosa 46 mg/ml;

Polisorbato 80 0,10 mg/ml.

Formulación 6: PG110 20 mg/ml, pH 6,0;

Histidina 2,33 mg/ml;

Trehalosa 46 mg/ml; y

Polisorbato 80 0,10 mg/ml.

La estabilidad al congelamiento-descongelamiento del anticuerpo ABT110 a concentraciones proteicas de 52 mg/ml y 20 mg/ml, después de 2 y después de 4 ciclos de f/t, respectivamente, se indica a continuación.

Tabla 37: Contenido de monómeros determinado por SEC/UV

	Form N° 1	Form N° 2	Form N° 3	Form N° 4	Form N° 5	Form N° 6
0 f/t	98,20	98,19	98,19	97,94	98,07	98,33
2 f/t	98,22	98,21	98,20	98,07	98,19	98,31
4 f/t	98,19	98,18	98,17	98,10	98,22	98,30

Los datos anteriores demuestran que la sacarosa, la trehalosa y el manitol son muy adecuados para conservar la estabilidad física de PG110 durante un estrés repetido de f/t. Prácticamente no se detectó degradación con respecto al contenido del monómero nativo de PG110 durante todo el experimento de estrés.

La estabilidad frente al estrés por agitación del anticuerpo ABT110 a concentraciones proteicas de 52 mg/ml y 20 mg/ml, después de 24 y 48 hs de agitación, respectivamente, se indica a continuación.

Tabla 38: Contenido de monómeros determinado por SEC/UV

	Form N° 1	Form N° 2	Form N° 3	Form N° 4	Form N° 5	Form N° 6
0 h	98,20	98,19	98,18	97,94	98,07	98,33
24 h	98,24	98,22	98,24	98,00	98,15	98,38
48 h	98,20	98,21	98,20	97,96	98,08	98,36

Los datos anteriores demuestran que la sacarosa, la trehalosa y el manitol son muy adecuados para conservar la estabilidad física de PG110 durante un estrés extensivo por agitación. Prácticamente no se detectó degradación con respecto al contenido del monómero nativo de PG110 durante todo el experimento de estrés.

La cinética de degradación acelerada del anticuerpo ABT110 a concentraciones proteicas de 52 mg/ml y 20 mg/ml, después de 14 días a 5°C y después de 14 días a 50°C, se indica a continuación.

Tabla 39: Contenido de monómeros determinado por SEC/UV

	Form N° 1	Form N° 2	Form N° 3	Form N° 4	Form N° 5	Form N° 6
0 h	98,20	98,19	98,19	97,94	98,07	98,33
14 d, 5°C	98,19	98,11	98,21	97,92	97,97	98,30
14 d, 50°C	85,16	85,09	85,29	84,82	85,04	84,82

Los datos anteriores demuestran que la sacarosa, la trehalosa y el manitol son muy adecuados para conservar la estabilidad física de PG110 durante el almacenamiento a largo plazo. Aún cuando era expuesto a 50 °C durante 14 días, más del 80% del monómero nativo estaba presente en todas las muestras evaluadas.

Ejemplo 11: Estabilidad a largo plazo de un polvo liofilizado de PG110 almacenado bajo distintas condiciones

Se estudió además la conveniencia de usar sacarosa y manitol como estabilizante durante

la liofilización y el almacenamiento de PG110. Se sometieron dos formulaciones de PG110 en polvo liofilizado para solución inyectable bajo condiciones de almacenamiento a largo plazo (2-8 °C), bajo condiciones de almacenamiento acelerado de 25°/60% de HR y bajo condiciones de estrés de 40 °C/75% de HR y 50°C. Estos lotes de productos de droga a escala de laboratorio se produjeron y liofilizaron a partir de 130 l de droga elaborados de acuerdo con métodos estándar. Para las pruebas, se resuspendieron muestras de las formulaciones en agua destilada, estéril, a temperatura ambiente, por ejemplo, como se detalla en la tabla 40.

Tabla 40. Condiciones para la liofilización de las formulaciones 1 y 2

Parámetros del programa	Temperatura de almacenamiento [±2°C]	Presión [mbar]	Tiempo [h:min]
Carga	+20°C	Atm,	---
Congelación	+20°-0°C	Atm,	0:20
	0°C	Atm,	2:10
	0°C--45°C	Atm,	2:30
	-45°C	Atm,	3:00
Secado primario	-45°C	0,66±0,01	1:00
	-45°C--25°C	0,66±0,01	1:00
	-25°C	0,66±0,01	90:00
Secado secundario	-25°C	0,36±0,01	01:00
	-25°C--25°C	0,36±0,01	04:30
	+25°C	0,36±0,01	08:00
Paso de retención	+25°C--5°C	0,36±0,01	0:30
	+5°C	0,36±0,01	---
Aireamiento preliminar y cierre	+5°C	Aproximadamente 500	---
Aireamiento	+5°C	Atm,	---

Para la evaluación, las muestras de las formulaciones se suspendieron una vez más en agua destilada estéril a temperatura ambiente

Formulación 1:

PG110 20 mg/ml, pH 5,5
histidina 2,33 mg/ml
sacarosa 70 mg/ml
Polisorbato 80 0,1 mg/ml

Formulación 2:

PG110 20 mg/ml, pH 5,5
histidina 2,33 mg/ml
sacarosa 10 mg/ml
Manitol 30 mg/ml
Polisorbato 80 0,1 mg/ml

Se condujeron métodos de prueba relacionados con la calidad, actividad biológica y pureza de la droga en distintos tiempos para evaluar el perfil de estabilidad de PG110 en cada lote. Los métodos analíticos usados incluyeron:

- Aspecto (visual)
- Partículas (visual)
- Partículas subvisibles (bloqueo de luz)
- pH
- Enfoque isoelectrico capilar por imágenes (icIEF)
- SDS PAGE (reducido y no reducido)
- HPLC por exclusión de tamaño
- Ensayo de unión al antígeno específico del producto
- Bioensayo funcional específico del producto

Se condujeron pruebas para la integridad de cierre del recipiente usando un método de penetración de colorante en el cual se expuso un vial de droga a vacío en una solución de azul de metileno, y luego se inspeccionó visualmente la coloración azul. El contenido de agua se determinó por USP, de acuerdo con los métodos estándar. Los datos de estabilidad obtenidos para las muestras de los lotes 1 y 2 se proveen en las Tablas 41-48.

Tabla 41: Estabilidad de la formulación 1 de PG110 liofilizado almacenado a 2-8°C

			Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Ensayo	Procedimiento	Características				

HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC)	HPLC	Agregados [%]	1,6	1,7	1,6	1,6
		Fragmentos [%]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
		Monómeros [%]	98,3	98,3	98,3	98,4
Enfoque isoeléctrico capilar (icIEF)	Enfoque isoeléctrico	Suma de la región ácida [%]	33,7	33,3	32,8	32,5
		Pico principal [%]	56,2	57,1	57,3	58,9
		Suma de la región básica [%]	10,1	9,7	9,9	8,6
SDS-electroforesis sobre gel (SDS-PAGE reductor)	SDS-Page (R)					
		Pureza [%]	99,6	99,5	99,6	99,7
SDS-electroforesis sobre gel (SDS-PAGE no reductor)	SDS-Page (NR)					
		Pureza [%]	92,3	92,2	91,8	90,6
		Banda presente a 97 kDa [%]	0,3	0,3	0,3	0,4
Contaminación de partículas - Partículas subvisibles	Part. subvis. (LO)	Partículas $\square$ 10 μ m [/recipiente]	30	7	19	14
		Partículas $\square$ 25 μ m [/recipiente]	1	0	1	2

Tabla 42: Estabilidad de la formulación 1 de PG110 liofilizada almacenada a 25 °C/60% de HR

					6 meses
Ensayo	Procedimiento	Características	Inicial	3 meses	6 meses
HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC)	HPLC	Agregados [%]	1,6	1,8	1,6
		Fragmentos [%]	< 0,1	< 0,1	< 0,1
		Monómeros [%]	98,3	98,2	98,4

Enfoque isoelectrico capilar (icIEF)	Enfoque isoelectrico	Suma de la región ácida [%]	33,7	34,0	31,7
		Pico principal [%]	56,2	57,2	59,2
		Suma de la región básica [%]	10,1	8,8	9,1
SDS- electroforesis sobre gel (SDS- PAGE reductor)	SDS-Page (R)				
		Pureza [%]	99,6	99,6	99,8
SDS- electroforesis sobre gel (SDS- PAGE no reductor)	SDS-Page (NR)				
		Pureza [%]	92,3	92,1	90,6
		Banda presente a 97 kDa [%]	0,3	0,4	0,3
Contaminación de partículas - Partículas subvisibles	Part. subvis. (LO)	Partículas $\square$ 10 μ m [/recipiente]	30	35	30
		Partículas $\square$ 25 μ m [/recipiente]	1	1	1

Tabla 43: Estabilidad de la formulación 1 de PG110 liofilizada almacenada a 40 °C/75% de HR

Ensayo	Procedimiento	Características	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
HPLC de exclusión por tamaño (SE- HPLC)	HPLC	Agregados [%]	1,6	1,7	1,7	1,7
		Fragmentos [%]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
		Monómeros [%]	98,3	98,3	98,2	98,3
Enfoque isoelectrico capilar (icIEF)	Enfoque isoelectrico	Suma de la región ácida [%]	33,7	33,6	33,1	32,5
		Pico principal [%]	56,2	56,4	55,9	55,1

						6
Ensayo	Procedimiento	Características	Inicial	1 mes	3 meses	meses
		Suma de la región básica [%]	10,1	10,0	11,0	12,3
SDS-electroforesis sobre gel (SDS-PAGE reductor)	SDS-Page (R)					
		Pureza [%]	99,6	99,6	99,5	99,7
SDS-electroforesis sobre gel (SDS-PAGE no reductor)	SDS-Page (NR)					
		Pureza [%]	92,3	92,6	91,4	90,9
		Banda presente a 97 kDa [%]	0,3	0,3	0,2	0,5
Contaminación de partículas - Partículas subvisibles	Part. subvis. - (LO)	Partículas $\square$ 10 μ m [/recipiente]	30	6	35	12
		Partículas $\square$ 25 μ m [/recipiente]	1	0	1	1

Tabla 44: Estabilidad de la formulación 1 de PG110 liofilizada almacenada a 50°C

Ensayo	Procedimiento	Características	Inicial	1 mes
HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC)	HPLC	Agregados [%]	1,6	1,7
		Fragmentos [%]	< 0,1	< 0,1
		Monómeros [%]	98,3	98,2
Enfoque isoelectrico capilar (icIEF)	Enfoque isoelectrico	Suma de la región ácida [%]	33,7	33,8
		Pico principal [%]	56,2	53,5
		Suma de la región básica [%]	10,1	12,7
SDS-electroforesis	SDS-Page (R)			

			Inicial	1 mes
Ensayo	Procedimiento	Características		
sobre gel (SDS-PAGE reductor)		Pureza [%]	99,6	99,6
SDS-electroforesis sobre gel (SDS-PAGE no reductor)	SDS-Page (NR)			
		Pureza [%]	92,3	92,6
		Banda presente a 97 kDa [%]	-	-
Contaminación de partículas - (LO)	Part. subvis.	Partículas □ 10 µm [recipiente]	30	1
Partículas subvisibles		Partículas □ 25 µm [recipiente]	1	0

Tabla 45: Estabilidad de la formulación 2 de PG110 liofilizado almacenado a 2-8°C

			Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Ensayo	Procedimiento	Características				
HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC)	HPLC	Agregados [%]	1,9	1,9	2	1,8
		Fragmentos [%]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
		Monómeros [%]	98,1	98	98	98,2
Enfoque isoeléctrico capilar (icIEF)	Enfoque isoeléctrico	Suma de la región ácida [%]	34,2	34	34	31,8
		Pico principal [%]	56,4	56,5	56,5	58,5
		Suma de la región básica [%]	9,5	9,5	9,5	9,6
SDS-electroforesis sobre gel (SDS-PAGE reductor)	SDS-Page (R)					
		Pureza [%]	99,6	99,4	99,5	99,5
SDS-electroforesis	SDS-Page (NR)					
		Pureza [%]	91,9	9.,7	90,7	90,2

			Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
Ensayo	Procedimiento	Características				
sobre gel (SDS-PAGE no reductor)		Banda presente a 97 kDa [%]	0,3	0,2	0,3	0,1
Contaminación de partículas - Partículas subvisibles	Part. subvis. (LO)	Partículas $\square$ 10 μ m [/recipiente]	43	6	19	25
		Partículas $\square$ 25 μ m [/recipiente]	1	0	0	0

Tabla 46: Estabilidad de la formulación 2 de PG110 liofilizada almacenada a 25 °C/60% de HR

			Inicial	3 meses	6 meses
Ensayo	Procedimiento	Características			
HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC)	HPLC	Agregados [%]	1,9	2,2	2,4
		Fragmentos [%]	< 0,1	< 0,1	< 0,1
		Monómeros [%]	98,1	97,8	97,6
Enfoque isoelectrico capilar (icIEF)	Enfoque isoelectrico	Suma de la región ácida [%]	34,2	34,1	32,6
		Pico principal [%]	56,4	55,7	56,5
		Suma de la región básica [%]	9,5	10,2	10,9
SDS-electroforesis sobre gel (SDS-PAGE reductor)	SDS-Page (R)				
		Pureza [%]	99,6	99,5	99,4
SDS-electroforesis sobre gel (SDS-PAGE no reductor)	SDS-Page (NR)				
		Pureza [%]	91,9	91,9	90,1
		Banda presente a 97 kDa [%]	0,3	0,3	0,3

Contaminación de partículas	Part. subvis. - (LO)	Partículas □ 10 μm [recipiente]	43	28	26
Partículas subvisibles		Partículas □ 25 μm [recipiente]	1	0	1

Tabla 47: Estabilidad de la formulación 2 de PG110 liofilizada almacenada a 40 °C/75% de HR

Ensayo	Procedimiento	Características	Inicial	1 mes	3 meses	6 meses
HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC)	HPLC	Agregados [%]	1,9	3,1	5,2	8,4
		Fragmentos [%]	< 0,1	< 0,1	0,1	0,1
		Monómeros [%]	98,1	96,9	94,8	91,6
Enfoque isoelectrico capilar (icIEF)	Enfoque isoelectrico	Suma de la región ácida [%]	34,2	34,6	33,6	39
		Pico principal [%]	56,4	47,8	33,8	21,4
		Suma de la región básica [%]	9,5	17,6	32,6	39,6
SDS-electroforesis sobre gel (SDS-PAGE reductor)	SDS-Page (R)	Pureza [%]	99,6	99,4	99,1	98,5

SDS-electroforesis sobre gel (SDS-PAGE no reductor)	SDS-Page (NR)	Pureza [%]	91,9	92,4	89,3	84,5
		Banda presente a 97 kDa [%]	0,3	0,2	0,2	0,2
Contaminación de partículas - Partículas subvisibles	Part. subvis. (LO)	Partículas $\square$ 10 μ m [/recipiente]	43	4	42	18
		Partículas $\square$ 25 μ m [/recipiente]	1	0	0	0

Tabla 48: Estabilidad de la formulación 2 de PG110 liofilizada almacenada a 50°C

Ensayo	Procedimiento	Características	Inicial	1 mes
HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC)	HPLC	Agregados [%]	1,9	6,2
		Fragmentos [%]	< 0,1	< 0,1
		Monómeros [%]	98,1	93,8
Enfoque isoelectrico capilar (icIEF)	Enfoque isoelectrico	Suma de la región ácida [%]	34,2	33,7
		Pico principal [%]	56,4	33,5
		Suma de la región básica [%]	9,5	32,8
SDS-electroforesis sobre gel (SDS-PAGE reductor)	SDS-Page (R)			
		Pureza [%]		
SDS-electroforesis sobre gel (SDS-	SDS-Page (NR)			
		Pureza [%]	91,9	93

PAGE no reductor)		Banda presente a 97 kDa [%]	0,3	0,2
Contaminación de partículas -	Part. subvis. (LO)	Partículas □ 10 µm [recipiente]	43	2
Partículas subvisibles		Partículas □ 25 µm [recipiente]	1	0

Todos los datos para las muestras de las Formulaciones 1 y 2 almacenadas bajo las condiciones de almacenamiento pretendidas de 2 a 8 °C, así como las muestras almacenadas a 25 °C y 40 °C durante 6 meses, cumplen con los criterios de aceptación y no se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros de estabilidad evaluados a estas temperaturas. El almacenamiento a las condiciones de estrés más extremas (50°C) por un mes dio como resultado una disminución en la pureza, lo cual solamente fue evidente según icIEF.

Una comparación de las Formulaciones 1 y 2 a 40°C sobre un período de 6 meses indicó que el anticuerpo PG110 formulado con sacarosa solamente, demostró un mayor nivel de estabilidad que el anticuerpo formulado con una combinación de sacarosa y manitol (Figura 1). Además, sorprendentemente se observó la formación de partículas subvisibles y visibles en estas formulaciones, que contienen una proporción molar entre el azúcar y/o el poliol y las proteínas mayor que aproximadamente (por ejemplo, formulación 1 – proteínas/azúcares = 1:1515, formulación 2 – proporción proteínas/[azúcares + poliol])

= 1436) que no cambia con el correr del tiempo, incluso en estudios acelerados a 40°C.

Incorporación a modo de referencia

La presente invención incorpora por completo a modo de referencia las técnicas bien conocidas en el campo de la formulación de proteínas. Estas técnicas incluyen, pero en un sentido no limitativo, las técnicas descritas en las siguientes publicaciones: Ausubel et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Ausubel, F. M. et al., eds., *Short Protocols In Molecular Biology* (4ª Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X). *Controlled Drug Bioavailability Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach*, 2a ed., páginas 20 1-16, Oxford University Press, Nueva York, N.Y., (1999); Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, vol. 2, páginas 115-138 (1984); Hammerling, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981; Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2a ed. 1988); Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991); Kabat, E. A., et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación del NIH N°: 91-3242; Kontermann and Dubel eds., *Antibody Engineering* (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 páginas (ISBN 3-540-41354-5); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); Lu and Weiner eds., *Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis* (2001) BioTechniques Press. Westborough, Mass. 298 páginas (ISBN 1-881299-21-X), *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Old, R. W. & S. B. Primrose, *Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering* (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. *Studies in Microbiology*; V.2: 409 páginas (ISBN 0-632-01318-4); Sambrook, J. et al., eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2a Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Volúmenes 1-3 (ISBN 0-87969-309-6); Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978; Winnacker, E. L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, N.Y. (traducido por Horst Ibelgauf). 634 páginas (ISBN 0-89573-614-4).

Equivalencias

La invención se puede realizar en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o de las características esenciales de la misma. Por ello, las formas de realización precedentes se deben considerar en todo respecto a efectos ilustrativos antes que limitativas de la invención que se describe en la presente. Por ello, el alcance de la invención está indicado por las reivindicaciones adjuntas antes que por la descripción anterior, así como todos los cambios.

RESUMEN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID N°: 1 (PG110 VH)

evqlvesggglvqpqgsrlscaasgfslnnnvnwvrqapgkglewvggvwaggatdysalksrftisrdnsntaylqmn
slraedtavyycardggysstlyamdawgggtltvss

SEQ ID N°: 2 (PG110 VL)

dqmtqspsslsasvgrvtitcrasediynalawyqqkpgkapklliyntdtlhtgvpsrfsqsgsgtdytlisslqpedfatyfc
qhyfhyptrfgqgkveik

SEQ ID N°: 3 (PG110 VH CDR 1)

GFSLTNNNVN

SEQ ID N°: 4 (PG110 VH CDR 2)

GVWAGGATDYSALKS

SEQ ID N°: 5 (PG110 VH CDR 3)

DGGYSSSTLYAMDA

SEQ ID N°: 6 (PG110 VL CDR 1)

RASEDIYNALA

SEQ ID N°: 7 (PG110 VL CDR 2)

NTDTLHT

SEQ ID N°: 8 (PG110 VL CDR 3)

QHYFHYPRT

SEQ ID N°: 9 (región constante de tipo salvaje de la IgG4 humana)

astkgpsvfplapcsrstsstaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtktytcnvdh
kpsntkvdkrveskygppcpScpapeflggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhnak
tkpreeqfnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssieltiskakgqprepvytlppsqeemtknqvslclvkgfy
psdiavewesngqpennyktpplvdsdgsfflysriltvdkswqegnvfscsvmhealhnhytqkslsislglk

SEQ ID N°: 10 (región constante mutada de serina por prolina de la IgG4 humana)

astkgpsvfplapcsrstsstaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtktytcnvdh
kpsntkvdkrveskygppcpScpapeflggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhnakt

kpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakggpprepqvylppsqeemtknqvslclvkgfyp
sdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflysrldksrwqegnvfscsvmhealhnhytqkslsislk

SEQ ID N°: 11 (secuencia de nucleótidos de la cadena pesada completa de PG110,
incluyendo la secuencia señal)

atggaatggagctgggtgttctgttcttctgagcgtgaccaccggcgtgcacagcgaggtgcagctggtcgagagcggcg
gagggctggtcagccaggcggcagcctgaggctgtcctgcgccccagcggcttcagcctgaccaacaacaacgtgaa
ctgggtgcggcaggccccaggcaagggcctggaatgggtgggcggtgtgggccccggggagccaccgactacaacag
cgccctgaagagcaggttcacatcagcagggaacaagcaagaacaccgcctacctgcagatgaacagcctgagggc
cgaggacaccgccgtgtactactgcgccaggacggcggttacagcagcagcaccctgtacgcatggacgcctggggc
cagggcaccctggtgaccgtgagcagcgccagcaccaagggccccagcgtgttccccctggccccctgcagcagaagca
ccagcgagagcacagccgctgggtgcctggtgaaggactactccccgagcccgtgaccgtgtcctggaacagcggga
gccctgaccagcggggtgcacacctccccgccgtgtgcagagcagcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacagt
cccagcagcagcctgggcaccaagacctacacctgcaacgtggaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaagag
ggtggagagcaagtacggccaccctgcccccatgccagccccgagttcctggcggaacctccgtgtttctgttcccc
ccaagccaaggacacctgatgatcagcaggacccccgaggtgacctgcgtggtggtagctgagccaggaagatcc
agaggtccagttcaactgttacgtggcggcgtggaggtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagtttaac
agcacctacaggggtgttccgtgtgaccgtgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtcaaggtctcc
aacaagggcctgccagctccatcgagaaaaccatcagcaaggccaagggccagccacgggagccccaggtgtacacc
ctgccaccctcccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtgaagggttctaccccagcgacatcg
ccgtggagtgggagagcaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccccagtgctggacagcgacggcagc
ttcttctgtacagcaggctgaccgtggacaagtccaggtggcaggaaggcaacgtctttagctgcagcgtgatgcagagg
ccctgcacaaccactacaccagaagagcctgtccctgagcctgggcaagtga

SEQ ID N°: 12 (secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa de PG110,
incluyendo la secuencia señal)

mewswvfflsvttgvhsevqlvesggglvqpggslrlscaasgfslnnnvnwvrqapkglewvggvwaggatdysal
ksrftisrdnsknaylqmnsiraedtavyycardggyssstlyamdawgggtltvssastkgpsvfplapcsrstsestaalg
clvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssglylssvvtvpssslgktytcnvdhkpsntkvdkrveskygppcp

a p e f l g g p s v f l f p p k p k d t l m i s r t p e v t c v v v d v s q e d p e v q f n w y v d g v e v h n a k t k p r e e q f n s t y r v v s v l t v l h q d w l
n g k e y k c k v s n k g l p s s i e k t i s k a k g q p r e p q v y t l p p s q e e m t k n q v s l t c l v k g f y p s d i a v e w e s n g q p e n n y k t t p p
v l d s d g s f f l y s r l t v d k s r w q e g n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s l g k

SEQ ID N°: 13 (secuencia de aminoácidos de la cadena pesada madura de PG110,
excluyendo la secuencia señal)

e v q l v e s g g g l v q p g g s l r l s c a a s g f s l t n n n v n w v r q a p g k l e w v g g v w a g g a t d y n s a l k s r f t i s r d n s k n t a y l q m n
s l r a e d t a v y y c a r d g g y s s t l y a m d a w g q g t l v t s s a s t k g p s v f l a p c s r s t s e s t a a l g c l v k d y f p e p v t v s w n s g a
l t s g v h t f a v l q s s g l y s l s s v t v p s s l g t k t y t c n v d h k p s n t k v d k r v e s k y g p p c p p c a p e f l g g p s v f l f p p k p k d t l
m i s r t p e v t c v v v d v s q e d p e v q f n w y v d g v e v h n a k t k p r e e q f n s t y r v v s v l t v l h q d w l n g k e y k c k v s n k g l p s s i e
k t i s k a k g q p r e p q v y t l p p s q e e m t k n q v s l t c l v k g f y p s d i a v e w e s n g q p e n n y k t t p p v l d s d g s f f l y s r l t v d k s r w
q e g n v f s c s v m h e a l h n h y t q k s l s l s l g k

SEQ ID N°: 14 (secuencia de nucleótidos de la cadena liviana completa de PG110,
incluyendo la secuencia señal)

a t g a g c g t g c c c a c c c a g g t g c t g g g c c t g c t g c t g t g g c t g a c c g a c g c c a g a t g c g a c a t c c a g a t g a c c c a g a g c
c c c a g c a g c c t g a g c g c c a g c g t g g g c g a c a g g g t g a c c a t c a c c t g c a g g g c c a g c g a g g a c a t c t a c a a c g c c c t g g
c c t g g t a t c a g c a g a a g c c c g g c a a g g c c c c a a g c t g c t g a t c t a c a a c a c c g a c a c c c t g c a c a c c g g c g t g c c c a g c
a g g t t c a g c g g c a g c g g t c c g g c a c c g a c t a c a c c c t g a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c c g a g g a c t t c g c c a c t a c t t t t
g c c a g c a c t a c t c c a c t a c c c a g g a c c t t c g g c a g g g c a c c a a g g t g g a g a t c a a g a g g a c c g t g g c t g c c c c a g c
g t g t c a t c t c c c c c c a g c g a c g a g c a g c t g a a g a g c g g c a c c g c c t c c g t g g t g t g c c t g t g a a c a a c t t c t a c c c c g
g g a g g c a a g g t g c a g t g g a a g g t g g a c a a c g c c t g c a g a g c g g c a a c a g c c a g g a a a g c g t c a c c g a g c a g g a c
a g c a a g g a c t c c a c t a c a g c c t g a g c a g c a c c c t g a c c c t g a g c a a g g c c g a c t a c g a g a a g c a a g g t g t a c g c c t
g c g a g g t g a c c c a c c a g g g c c t g t c c a g c c c c g t g a c c a a g a g c t t c a a c a g g g g c g a g t g c t g a

SEQ ID N°: 15 (secuencia de aminoácidos de la cadena liviana completa de PG110,
incluyendo la secuencia señal)

m s v p t q v l g l l l l w l d a r c d i q m t q s p s s l s a s v g d r v t i t c r a s e d i y n a l a w y q q k p g k a p k l i y n t d t l h t g v p s r f s g s g s g
t d y t l t i s s l q p e d f a t y f c q h y f h y p r t f g q g t k v e i k r t v a a p s v f i f p p s d e q l k s g t a s v v c l l n n f y p r e a k v q w k v d n a l q s
g n s q e s v t e q d s k d s t y s l s s t l t l s k a d y e k h k v y a c e v t h q g l s s p v t k s f n r g e c

SEQ ID N°: 16 (secuencia de aminoácidos de la cadena liviana madura de PG110,
excluyendo la secuencia señal)

diqmtqspsslsasvgdrvtitcrasediynalawyqqkpgkapklliyntdtlhtgvpsrfsqsgsgtdytlitisslqpedfatyfc
qhyfhyprtfqggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkdnaqlsgnsqesvteqdsdsty
slsstltlskadyekkhkyacevthqglsspvtksfnrgec

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende
 - (a) un anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso (NGF) o un fragmento de unión al antígeno de éste;
 - (b) un amortiguador de histidina en una concentración de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 60 mM; y
 - (c) polisorbato 80 en una concentración de entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,1%;donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende histidina aproximadamente entre 10 y 30 mM.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde el pH es de aproximadamente 5,5.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la composición comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,02% de polisorbato 80.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la composición también comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg/ml de un poliol.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde el poliol se selecciona del grupo que consiste en el sorbitol y el manitol.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en donde el poliol es manitol.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en donde la composición comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 mg/ml de manitol.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la composición también comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 mg/ml de un azúcar.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en donde el azúcar es la

sacarosa.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, en donde la composición comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 70 mg/ml de sacarosa.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición no comprende un poliol o un azúcar.

13. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición no comprende metionina.

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la concentración del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de éste es de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 240 mg/ml.

15. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde la concentración del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de éste es de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 120 mg/ml.

16. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y 13-15, en donde la relación molar de (a) un anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, a (b) un poliol, azúcar o una combinación de los mismos, es mayor que 1:1400.

17. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende

(a) aproximadamente 20 mg/ml del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de éste;

(b) histidina aproximadamente 15 mM; y

(c) aproximadamente 0,01% de polisorbato 80;

donde el pH de la formulación es de aproximadamente 5,5.

18. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende

(a) aproximadamente 60 mg/ml del anticuerpo o de la porción de unión al antígeno de

éste;

- (b) histidina aproximadamente 30 mM; y
- (c) aproximadamente 0,02% de polisorbato 80;

donde el pH de la formulación es de aproximadamente 5,5.

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en donde es apropiada para la liofilización.

20. Una composición liofilizada farmacéutica que comprende

- (a) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 120 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste;
- (b) entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg de histidina; y
- (c) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 0,4 mg de polisorbato 80.

21. La composición liofilizada farmacéutica de la reivindicación 20, en donde la composición comprende

- (a) aproximadamente 60 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste;
- (b) aproximadamente 4,7 mg de histidina; y
- (c) aproximadamente 0,2 mg de polisorbato 80.

22. La composición liofilizada farmacéutica de la reivindicación 20, en donde la composición comprende

- (a) aproximadamente 20 mg de un anticuerpo anti-NGF o de un fragmento de unión al antígeno de éste;
- (b) aproximadamente 2,3 mg de histidina; y
- (c) aproximadamente 0,1 mg de polisorbato 80.

23. La composición liofilizada farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en donde también comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg de un poliol.

24. La composición liofilizada farmacéutica de la reivindicación 23, en donde el poliol

comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg manitol.

25. La composición liofilizada farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en donde también comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mg de un azúcar.

26. La composición liofilizada farmacéutica de la reivindicación 25, en donde el azúcar comprende aproximadamente entre 1 y 100 mg de sacarosa.

27. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo anti-NGF, o la porción de unión al antígeno de éste, se une al NGF humano.

28. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo anti-NGF, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una región constante de la IgG4 humana.

29. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo anti-NGF, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una mutación en la región de la bisagra.

30. La composición farmacéutica de la reivindicación 29, en donde la mutación en la región de la bisagra comprende una mutación en la serina en la posición del aminoácido 108 de SEQ ID N° 9.

31. La composición farmacéutica de la reivindicación 29, en donde la serina en la posición del aminoácido 108 de SEQ ID N° 9 se muta en prolina.

32. La composición farmacéutica de la reivindicación 29, en donde la región constante de la IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 10.

33. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, tiene una o más de las siguientes propiedades funcionales:

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

- b) se une al NGF humano o de rata con una KD de 100 pM o menos;
- c) inhibe la unión del NGF a TrkA o a p75NTR;
- d) inhibe la proliferación de las células TF-1 dependiente del NGF;
- e) inhibe la supervivencia del ganglio de la raíz dorsal del pollo dependiente del NGF;
- f) inhibe el desarrollo de las neuritas de las células PC12 dependiente del NGF.

34. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, no presenta un efecto de rebote cuando se lo administra a un sujeto.

35. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 3, 4 y 5, respectivamente.

36. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una región variable de la cadena liviana que comprende las CDR 1, 2 y 3, que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N° 6, 7 y 8, respectivamente.

37. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1.

38. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2.

39. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, compite por la unión al NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2.

40. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 13.

41. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 y 40, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, también comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 16, en donde el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, además comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 16.

42. Una composición farmacéutica, que comprende:

(a) un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF), o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende (i) una región variable de la cadena pesada que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N°:3, 4 y 5, respectivamente, (ii) una región variable de la cadena liviana que comprende las CDRs 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID N°:6, 7 y 8, respectivamente, y (iii) una región constante de la IgG4 humana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:10, en donde la concentración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/ml;

(b) una solución amortiguadora de histidina a una concentración de histidina de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 mM; y

(c) polisorbato 80 a una concentración de entre aproximadamente 0,01% y 0,02%;

en donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.

43. Una composición farmacéutica, que comprende:

(a) un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende (i) una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:1, (ii) una región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:2 y (iii) una región constante de la IgG4 humana que comprende una mutación en la región bisagra en la posición 108 de la SEQ ID N°: 9, en donde la concentración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/ml;

(b) una solución amortiguadora de histidina a una concentración de histidina de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 mM; y

(c) polisorbato 80 a una concentración de entre aproximadamente 0,01% y 0,02%; en donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.

44. Una composición farmacéutica, que comprende:

(a) un anticuerpo anti-factor de crecimiento nervioso (NGF) que comprende una región constante de la IgG4 humana, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:13 y una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°:16, en donde la concentración del anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, es de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/ml;

(b) una solución amortiguadora de histidina a una concentración de histidina de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 mM; y

(c) polisorbato 80 a una concentración de entre aproximadamente 0,01% y 0,02%; en donde el pH de la composición es de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0.

45. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, que comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/ml de manitol.

46. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 45, que

comprende entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mg/ml de sacarosa.

47. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, que consiste esencialmente de:

(a) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo;

(b) aproximadamente 15 mM de solución amortiguadora de histidina; y

(c) aproximadamente 0,01% de polisorbato 80;

en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5,5.

48. La composición farmacéutica de la reivindicación 45, que consiste esencialmente de:

(a) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo;

(b) aproximadamente 15 mM de solución amortiguadora de histidina; y

(c) aproximadamente 0,01% de polisorbato 80; y

(d) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml de manitol;

en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5,5.

49. La composición farmacéutica de la reivindicación 46, que consiste esencialmente de:

(a) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo;

(b) aproximadamente 15 mM de solución amortiguadora de histidina; y

(c) aproximadamente 0,01% de polisorbato 80; y

(d) entre aproximadamente 40 y 70 mg/ml de sacarosa;

en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5,5.

50. La composición farmacéutica de la reivindicación 46, que consiste esencialmente de:

(a) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno

del mismo;

(b) aproximadamente 15 mM de solución amortiguadora de histidina; y

(c) aproximadamente 0,01% de polisorbato 80;

(d) entre aproximadamente 10 y 30 mg/ml de manitol; y

(e) entre aproximadamente 5 y 10 mg/ml de sacarosa;

en donde el pH de la composición es de aproximadamente 5,5.

51. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 50, en donde la relación de anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, a poliol y/o azúcar es mayor que 1-69:1400.

52. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 42 a 51, en donde la composición farmacéutica está liofilizada.

53. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo con una CDR injertada, un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv con enlaces disulfuro, un scFv, un anticuerpo de un solo dominio, un diacuerpo, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo con especificidad dual y un anticuerpo biespecífico.

54. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno de éste, es el anticuerpo PG110.

55. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable en una forma líquida durante al menos aproximadamente 3 meses.

56. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable en una forma líquida durante al menos aproximadamente 12 meses.

57. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes,

en donde la formulación es estable durante al menos 3 meses en una forma congelada o liofilizada.

58. La composición farmacéutica de la reivindicación 57, en donde la formulación es estable durante por lo menos 6 meses en una forma congelada o liofilizada.

59. La composición farmacéutica de la reivindicación 57, en donde la formulación es estable durante por lo menos 12 meses en una forma congelada o liofilizada.

59. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 55 ó 56, en donde la formulación se guarda a 2-8°C.

60. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 57 ó 58, en donde la formulación se guarda congelada a -80°C.

61. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 57 ó 58, en donde la formulación se guarda en forma liofilizada a 2-8°C.

62. La composición farmacéutica de las reivindicaciones 57 ó 58, en donde la formulación se guarda en forma liofilizada a temperatura ambiente.

63. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 55 a 63, en donde hay menos que aproximadamente un 10% de agregación del anticuerpo.

64. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 55 a 63, en donde hay menos que aproximadamente un 3% de agregación del anticuerpo.

65. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es apropiada para la administración intravenosa, subcutánea y/o intramuscular.

66. Un dispositivo que comprende la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-65.

67. El dispositivo de la reivindicación 66, en donde el dispositivo se selecciona del grupo que consiste en una jeringa, una lanceta, un implante, un dispositivo de inyección libre de agujas, un dispositivo de inhalación y un parche.

68. Un artículo de manufactura que comprende la composición farmacéutica o el

dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-67.

69. Uso de la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-65, o del dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 66-67, en donde es para tratar una enfermedad o condición mediada por NGF.

70. El uso de la reivindicación 69, en donde la enfermedad o la afección relacionada con el NGF son el dolor.

71. El uso de la reivindicación 70, en donde el dolor se selecciona del grupo que consiste en el dolor provocado por la osteoartritis, el dolor crónico en la parte baja de la espalda, el dolor neuropático de origen diabético, el dolor provocado por el cáncer, el dolor provocado por las metástasis en los huesos, la cistitis intersticial, el síndrome de la vejiga dolorosa, el dolor asociado con la prostatitis abacteriana crónica, el dolor asociado con la endometriosis, el dolor asociado con los fibroides uterinos y el dolor postoperatorio.

72. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 69-71, en donde la composición farmacéutica es adecuada para la administración del anticuerpo anti-NGF, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, a una dosis en un rango de entre 0,1 mg/kg y 10/mg/kg.

73. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 69-72, en donde la composición farmacéutica es adecuada para una administración por vía intravenosa, subcutánea o intra-articular.

74. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 69-74, en donde la composición farmacéutica es adecuada para su administración con un segundo agente farmacéutico.

75. El uso de la reivindicación 74, en donde el segundo agente farmacéutico se selecciona del grupo que consiste en las NSAID, los analgésicos, incluyendo los analgésicos opiáceos y los analgésicos atípicos, los anestésicos locales, los bloqueadores nerviosos, los bloqueadores de fenol, los anticuerpos terapéuticos, los esteroides, los anticonvulsivos, los antidepresivos, la capsaicina tópica, los agentes antivirales, los inhibidores de TrkA y los inhibidores de PKC.

**COMPOSICIONES DE ANTICUERPOS ANTI-FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO
(NGF)**

RESUMEN

Composiciones estables de anticuerpos anti-NGF y de fragmentos de unión al antígeno de éstos. Su uso en la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos en los que la actividad del NGF es perjudicial, por ejemplo, los trastornos de dolor.