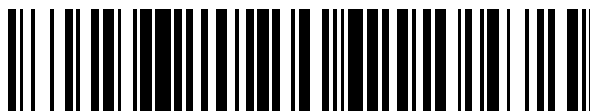


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 596**

51 Int. Cl.:

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.09.2009** **PCT/IB2009/054111**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010** **WO10032220**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.09.2009** **E 09787253 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018** **EP 2331090**

54 Título: **Formulación líquida estable de anticuerpos**

30 Prioridad:

19.09.2008 US 98305 P

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

12.03.2018

73 Titular/es:

**PFIZER INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017, US**

72 Inventor/es:

**BADKAR, ADVAIT VIJAY;
BOHACK, LEIGH KRISTEN;
KING, KEVIN ROGER y
LARY, ALANTA LEA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 658 596 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulación líquida estable de anticuerpos

La presente invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas de anticuerpos. En concreto, la presente invención se refiere a una formulación líquida estable de anticuerpos y a su preparación y uso farmacéutico.

Antecedentes de la invención

Las preparaciones de anticuerpos destinadas a uso terapéutico o profiláctico requieren estabilizantes para evitar la pérdida de actividad o de integridad estructural de la proteína debido a los efectos de la desnaturalización, oxidación o agregación a lo largo de un periodo de tiempo durante el almacenamiento y transporte antes del uso. Estos problemas empeoran a las altas concentraciones de anticuerpo deseadas con frecuencia para su administración terapéutica.

Un objetivo principal en el desarrollo de formulaciones de anticuerpos es mantener la solubilidad, estabilidad y potencia de unión a antígeno del anticuerpo. Es particularmente deseable evitar agregados y particulados en solución, que requerirían esterilización por filtración antes de su uso para inyección intravenosa o subcutánea y limitarían la vía de administración. Los agregados de anticuerpos pueden causar dolor y efectos secundarios anafilactoides cuando la formulación que los contiene se inyecta por vía intravenosa.

La liofilización y el secado por congelación son alternativas a la formulación líquida de anticuerpos. Ambos procedimientos tienen tendencia a inducir la desnaturalización del anticuerpo y disminuir su actividad de unión a antígeno, particularmente tras su reconstitución.

Las sales, tensioactivos, agentes de pH y de tonicidad tales como azúcares, pueden contribuir a superar los problemas de agregación. La formulación de preparaciones de anticuerpos requiere una selección cuidadosa de estos factores entre otros para evitar la desnaturalización de la proteína y la pérdida de actividad de unión a antígeno. Respecto a un intervalo de pH de una preparación de anticuerpo, si una formulación de anticuerpo que tiene un bajo valor de pH se inyecta por vía intravenosa a menudo se produce dolor o inyección. Cuando una formulación de anticuerpo se usa como una inyección es deseable que tenga un valor de pH en un intervalo de pH aproximadamente neutro, también es ventajoso minimizar los niveles de tensioactivo para evitar burbujas en la formulación que sean perjudiciales para su inyección a sujetos.

Se conoce una formulación líquida de anticuerpo monoclonal anti-CTLA4 a partir del documento WO2006/096491 (Pharmacia and Upjohn Company), y comprende anticuerpo 20 mg/ml, tampón de histidina 20 mM, trehalosa 84 mg/ml, tensioactivo PS80 0,2 mg/ml, EDTA 0,05 mg/ml pH 5,5.

Existe la necesidad de una formulación líquida estable de anticuerpo que sirva de soporte de forma estable a altas concentraciones de anticuerpo bioactivo en solución y sea adecuada para su administración parenteral, incluyendo la inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. Es deseable además que la formulación tenga un riesgo minimizado de formación de burbujas y efectos secundarios anafilactoides.

Además, existe la necesidad de proporcionar dicha formulación líquida estable para un anticuerpo anti-NGF. Se sabe que el NGF desempeña un papel central en el desarrollo y mantenimiento de neuronas tanto centrales como periféricas. Además de sus efectos en el sistema nervioso, los niveles de NGF aumentados se han relacionado una diversidad de afecciones inflamatorias, incluyendo lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, psoriasis, artritis, cistitis intersticial y asma. El NGF también tiene una actividad demostrada en una diversidad de afecciones dolorosas. Se ha demostrado que el anticuerpo anti-NGF E3 es útil en el tratamiento de afecciones de dolor crónico y agudo, incluyendo dolor por cáncer, dolor por artritis reumatoide, dolor por artrosis y dolor postquirúrgico también (véase, por ejemplo, el documento WO2004/058184). Existe la necesidad de una preparación líquida estable de anticuerpo de un anticuerpo anti-NGF para satisfacer la necesidad médica de pacientes que padecen afecciones inflamatorias y de dolor mediadas por NGF.

El documento WO2006/096488, desvela composiciones de anticuerpos anti-CTLA4 que comprenden EDTA, histidina, trehalosa, polisorbato 80. El documento WO2006096490 informa de una composición reconstituida que contiene anticuerpo IgG1 humanizado, histidina, sacarosa, polisorbato y alcohol bencílico. El documento WO2006096461 describe formulaciones que comprenden anticuerpo anti-M-CSF monoclonal, EDTA, tampón histidina, polisorbato 80 y un agente de tonicidad de manitol. El documento WO2006096489 desvela composiciones líquidas de anticuerpo anti-M-CSF humano.

Breve resumen de la invención

De acuerdo con la presente invención se proporciona:

Una composición líquida que comprende un anticuerpo anti-NGF;
un agente de tonicidad;

- un tampón;
un agente quelante;
un tensioactivo;
en la que el pH de dicha composición es de 5,8 a 6,8,
5 en la que el tensioactivo es polisorbato 20,
en la que el tampón es histidina;
en la que el agente de tonicidad es trehalosa; y
en la que el anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada variable de SEQ ID NO. 1 y una secuencia de cadena ligera variable de SEQ ID NO. 2.
- 10 La presente divulgación proporciona una composición líquida que comprende; al menos un anticuerpo, al menos un agente de tonicidad, al menos un tampón, al menos un agente quelante, al menos un tensioactivo, en la que el pH de dicha composición es de 5,8 a 6,8.
- La presente divulgación también proporciona una composición líquida que consiste en, o que consiste esencialmente en; al menos un anticuerpo, al menos un agente de tonicidad, al menos un tampón, al menos un agente quelante, al menos un tensioactivo, en el que el pH de dicha composición es de 5,8 a 6,8.
- 15 La composición líquida de acuerdo con la presente invención proporciona las ventajas de que sirve de soporte de forma estable a altas concentraciones de anticuerpo bioactivo en solución y es adecuada para administración parenteral, incluyendo inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica o subcutánea. Además tiene un riesgo minimizado de formación de burbujas y efectos secundarios anafilactoides.
- 20 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención la composición líquida puede comprender al menos un anticuerpo. En algunas divulgaciones, puede estar presente más de un anticuerpo. Pueden estar presentes al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o más anticuerpos diferentes. Generalmente, los dos o más anticuerpos diferentes tienen actividades complementarias que no se ven afectadas perjudicialmente entre sí. El, o cada, anticuerpo también puede usarse junto con otros agentes que sirven para potenciar y/o complementar la eficacia de los anticuerpos.
- 25 De acuerdo con la presente divulgación, el pH puede estar en el intervalo de 5,0 a 7,5, más preferentemente entre aproximadamente un pH de 7,5 y cualquiera de un pH de 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 o 5,5. Además, preferentemente, el pH está en el intervalo seleccionado de entre uno cualquiera de un pH de 5,6, 5,7 o 5,8 y uno cualquiera de aproximadamente un pH de 7,5, 7,4, 7,3, 7,2, 7,1, 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8 o 5,7.
- 30 En una realización preferida, el pH puede estar en el intervalo de entre un pH de 5,5 y cualquiera de un pH de 6,0, 6,2, 6,5 o 6,8, como alternativa de acuerdo con la invención el pH puede estar en el intervalo de entre aproximadamente un pH de 5,8 y cualquiera de aproximadamente un pH de 6,0, 6,2, 6,5 o 6,8.
- Como se desvela en el presente documento el pH puede seleccionarse de valores de pH de cualquiera de 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 o 7,5, más preferentemente el pH es un pH de 6,0 +/- 0,2. Valores de pH en estos intervalos proporcionan a la composición líquida una protección aumentada frente a la agregación y fragmentación de anticuerpos y están próximos al pH fisiológico (pH de aproximadamente 7,2 a 7,4) para reducir el riesgo de dolor o efectos secundarios anafilactoides en la inyección.
- 35 De acuerdo con la presente divulgación, el agente de tonicidad comprende preferentemente un poliol, un sacárido, un carbohidrato, una sal, tal como cloruro sódico, o mezclas de los mismos. Preferentemente el poliol tiene un peso molecular que es inferior a aproximadamente 600 kD (por ejemplo, en el intervalo de 120 a 400 kD), preferentemente seleccionado de manitol, trehalosa, sorbitol, eritritol, isomaltita, lactitol, maltitol, xilitol, glicerol, lactitol, propilenglicol, polietilenglicol, inositol o mezclas de los mismos. Preferentemente, el sacárido o carbohidrato se selecciona del grupo de monosacáridos, disacáridos y polisacáridos, o mezclas de los mismos. Preferentemente, el sacárido o carbohidrato se selecciona del grupo que consiste en fructosa, glucosa, manosa, sacarosa, sorbosa, xilosa, lactosa, maltosa, sacarosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrinas, almidón soluble, hidroxietil almidón, glucanos solubles en agua y mezclas de los mismos. Preferentemente, el agente de tonicidad comprende un sacárido seleccionado del grupo de azúcar reductor o azúcar no reductor o mezclas de los mismos. Preferentemente además, el agente de tonicidad comprende un sacárido que es un azúcar no reductor, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa y mezclas de los mismos. Más preferentemente, de acuerdo con la invención, el agente de tonicidad comprende trehalosa, preferentemente trehalosa dihidrato. De acuerdo con la presente invención, el agente de tonicidad, particularmente trehalosa, preferentemente trehalosa dihidrato, proporciona a la composición líquida una estabilidad de anticuerpo aumentada y resistencia a la agregación, oxidación y fragmentación durante el almacenamiento refrigerado, por ejemplo, de 0 a 10°C, particularmente de 5 a 8°C, más particularmente 5°C, o el almacenamiento congelado, y en ciclos de congelación y descongelación. La trehalosa es particularmente ventajosa ya que la formulación de anticuerpo resultante no experimenta glucosilación.
- 40 45 50 55 La concentración del agente de tonicidad en la composición líquida varía de 1 mg/ml a 300 mg/ml, de 1 mg/ml a 200 mg/ml, o de 1 mg/ml a 100 mg/ml. Preferentemente, la concentración del agente de tonicidad en la composición líquida es de 60 mg/ml, 65 mg/ml, 70 mg/ml, 75 mg/ml, 80 mg/ml, 81 mg/ml, 82 mg/ml, 83 mg/ml, 84 mg/ml, 85

mg/ml, 86 mg/ml, 87 mg/ml, 88 mg/ml, 89 mg/ml, 90 mg/ml, 91 mg/ml, 92 mg/ml, 93 mg/ml, 94 mg/ml, 95 mg/ml, 96 mg/ml, 97 mg/ml, 98 mg/ml, 99 mg/ml, 100 mg/ml, 105 mg/ml, 110 mg/ml, 120 mg/ml o 130 mg/ml. Más preferentemente, la concentración del agente de tonicidad en la composición líquida es de 84 mg/ml.

Cuando el agente de tonicidad comprende una sal, la concentración de la sal en la composición líquida varía de 1 mg/ml a 20 mg/ml. Las sales que son farmacéuticamente aceptables y adecuadas para la presente divulgación incluyen cloruro sódico, succinato sódico, sulfato sódico, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y cloruro cálcico. Las sales preferidas para la presente divulgación son cloruro sódico y cloruro de magnesio, el cloruro de magnesio también puede mejorar la estabilidad del anticuerpo protegiendo a la proteína frente a la desamidación. Preferentemente, la sal en la composición líquida se selecciona de un intervalo de concentraciones de cualquiera de aproximadamente 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8, mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml y 20 mg/ml.

De acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación, el tensioactivo se selecciona preferentemente del grupo que consiste en polisorbatos, poloxámeros, tritones, dodecilsulfato sódico, laurilsulfato sódico, octilglucósido sódico, lauril-sulfobetaina, miristil-sulfobetaina, linoleil-sulfobetaina, estearil-sulfobetaina, lauril-sarcosina, miristil-sarcosina, linoleil-sarcosina, estearil-sarcosina, linoleil-betaína, miristil-betaína, cetil-betaína, lauroamidopropil-betaína, cocamidopropil-betaína, linoleamidopropil-betaína, miristamidopropil-betaína, palmidopropil-betaína, isoestearamidopropil-betaína, miristamidopropil-dimetilamina, palmidopropil-dimetilamina, isoestearamidopropil-dimetilamina, metil cocoil-aurato sódico, metil oleil-aurato disódico, cloruro de dihidroxipropil PEG 5 linoleamonio, polietilenglicol, polipropilenglicol y mezclas de los mismos. Además, preferentemente, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 21, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 61, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81, polisorbato 85 y mezclas de los mismos. Más preferentemente, el tensioactivo se selecciona de polisorbato 20, polisorbato 80, PEG3350 o mezclas de los mismos. Más preferentemente, de acuerdo con la presente invención, el tensioactivo es polisorbato 20. De acuerdo con la presente invención, el tensioactivo, particularmente polisorbato 20, proporciona a la composición líquida una estabilidad de anticuerpo aumentada y resistencia frente a la agregación y fragmentación.

La concentración del tensioactivo generalmente varía de 0,01 mg/ml a 10 mg/ml, de 0,01 mg/ml a 5,0 mg/ml, de 0,01 mg/ml a 2,0 mg/ml, de 0,01 mg/ml a 1,5 mg/ml, de 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml, de 0,01 mg/ml a 0,5 mg/ml, de 0,01 mg/ml a 0,4 mg/ml, de 0,01 mg/ml a 0,3 mg/ml, de 0,01 mg/ml a 0,2 mg/ml, de 0,01 mg/ml a 0,15 mg/ml, de 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml o de 0,01 mg/ml a 0,05 mg/ml. Además, preferentemente, la concentración del tensioactivo es de 0,5 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,07 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,09 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,11 mg/ml, 0,12 mg/ml, 0,13 mg/ml, 0,14 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,16 mg/ml, 0,17 mg/ml, 0,18 mg/ml, 0,19 mg/ml, 0,2 mg/ml. Más preferentemente, la concentración del tensioactivo es de 0,1 mg/ml. Son altamente preferidas realizaciones con una concentración del tensioactivo de 0,1 mg/ml ya que esta concentración permite el mantenimiento de la estabilidad del anticuerpo de la formulación en solución, reduciendo al mismo tiempo la tendencia a la formación de burbujas en la formulación durante la preparación de la formulación, la manipulación de la formulación y la preparación para su administración parenteral, y especialmente la tensión relacionada con las sacudidas y la agitación durante la preparación y también durante el transporte.

De acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación, el tampón puede seleccionarse del grupo que consiste en acetato, succinato, gluconato, citrato, histidina, ácido acético, fosfato, ácido fosfórico, ascorbato, ácido tartárico, ácido maleico, glicina, lactato, ácido láctico, ácido ascórbico, imidazol, bicarbonato y ácido carbónico, ácido succínico, benzoato sódico, ácido benzoico, gluconato, edetato, acetato, imidazol, tris, fosfato y mezclas de los mismos. Preferentemente, de acuerdo con la presente invención, el tampón es histidina, en el que la histidina puede comprender L-histidina o D-histidina, una forma solvatada de histidina, una forma hidratada (por ejemplo, monohidrato) de histidina o una forma anhidra de histidina, o una mezcla de las mismas. De acuerdo con la presente invención, el tampón, particularmente el tampón preferido histidina, proporciona a la composición líquida un pH próximo al pH fisiológico para una reducción del riesgo de dolor o efectos secundarios anafilactoides en la inyección, y también proporciona una estabilidad de anticuerpo aumentada y resistencia a la agregación, oxidación y fragmentación.

La concentración del tampón puede variar de 0,1 milimolar (mM) a 100 mM. Preferentemente, la concentración del tampón es de 0,5 mM a 50 mM, preferentemente además de 1 mM a 30 mM, más preferentemente de 1 mM a 18 mM, cada vez más preferentemente de 1 mM a 15 mM. Preferentemente, la concentración del tampón es de 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM. Más preferentemente, la concentración del tampón es de 10 mM.

De acuerdo con una realización preferida de la presente divulgación, el agente quelante puede seleccionarse del grupo que consiste en ácidos aminopolicarboxílicos, ácidos hidroxiaminocarboxílicos, glicinas *N*-sustituidas, ácido 2-(2-amino-2-oxotil)aminoetano sulfónico (BES), deferoxamina (DEF), ácido cítrico, niacinamida y desoxicolatos y mezclas de los mismos. Además, preferentemente, el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido *N*-2-acetamido-2-iminodiacético (ADA), bis(aminoetil)glicoléter, ácido *N,N,N',N'*-tetraacético (EGTA), ácido

trans-diaminociclohexano tetraacético (DCTA), ácido glutámico y ácido aspártico; ácido *N*-hidroxietiliminodiacético (HIMDA), *N,N*-bis-hidroxietilglicina (bicina) y *N*-(trishidroximetilmetil) 10 glicina (tricina), glicilglicina, desoxicolato sódico, etilendiamina; propilendiamina; dietilentriamina; trietilentetraamina (trieno), etilendiaminotetraaceto EDTA; EDTA disódico, EDTA cálcico, ácido oxálico, malato, ácido cítrico, ácido cítrico monohidrato y citrato-dihidrato trisódico, 8-hidroxiquinolato, aminoácidos, histidina, cisteína, metionina, péptidos, polipéptidos y proteínas y mezclas de los mismos. Además, preferentemente, el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en sales de EDTA incluyendo edetato dipotásico, edetato disódico, edetato de calcio disódico, edetato sódico, edetato trisódico y edetato de potasio; y una sal adecuada de deferoxamina (DEF) es mesilato de deferoxamina (DFM), o mezclas de los mismos. Los agentes quelantes usados en la invención pueden estar presentes, cuando sea posible, como la forma de ácido libre o base libre o forma de sal del compuesto, también como forma anhidra, solvatada o hidratada del compuesto o sal correspondiente.

Más preferentemente, el agente quelante es EDTA disódico, EDTA cálcico, más preferentemente EDTA disódico.

Es particularmente preferible EDTA disódico ya que proporciona a la composición líquida una estabilidad de anticuerpo aumentada y/o resistencia a la agregación.

La concentración de agente quelante varía generalmente de 0,01 mg/ml a 50 mg/ml, de 1 mg/ml a 10,0 mg/ml, de 15 mg/ml a 5,0 mg/ml, de 0,01 mg/ml a 1,0 mg/ml, o de 0,03 mg/ml a 0,5 mg/ml. Además, preferentemente, la concentración de agente quelante varía generalmente de 0,01 mM a 2,0 mM, de 0,01 mM a 1,5 mM, de 0,01 mM a 0,5 mM, de 0,01 mM a 0,4 mM, de 0,01 mM a 0,3 mM, de 0,01 mM a 0,2 mM, de 0,01 mM a 0,15 mM, de 0,01 mM a 0,1 mM, de 0,01 mM a 0,09 mM, de 0,01 mM a 0,08 mM, de 0,01 mM a 0,07 mM, de 0,01 mM a 0,06 mM, de 0,01 mM a 0,05 mM, de 0,01 mM a 0,04 mM, de 0,01 mM a 0,03 mM, de 0,01 mM a 0,02 mM o de 0,05 mM a 0,01 mM. Preferentemente, la concentración de agente quelante puede ser de 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,07 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,20 mg/ml. Además, preferentemente, la concentración de agente quelante es de 0,045 mg/ml, 0,046 mg/ml, 0,047 mg/ml, 0,048 mg/ml, 0,049 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,051 mg/ml, 0,052 mg/ml, 0,053 mg/ml, 0,054 mg/ml, 0,055 mg/ml o 0,056 mg/ml. Más preferentemente, la concentración de agente quelante es de 0,05 mg/ml.

Los agentes quelantes pueden disminuir la formación de especies de oxígeno reducidas, reducir la formación de especies ácidas (por ejemplo, desamidación), reducir la agregación de anticuerpos y/o reducir la fragmentación de anticuerpos y/o reducir la oxidación de anticuerpos en las composiciones de la presente invención. Dichos agentes quelantes pueden reducir o prevenir la degradación de un anticuerpo que se formula en comparación con el anticuerpo sin la protección de un agente quelante.

A menos que se indique otra cosa, las concentraciones enumeradas en el presente documento son las concentraciones en condiciones ambientales [es decir, a 25°C y presión atmosférica].

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la composición líquida puede comprender además un agente antioxidante. Preferentemente, el agente antioxidante se selecciona del grupo que comprende metionina, tiosulfato sódico, catalasa y platino. La concentración de antioxidante generalmente varía de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 5,0 mg/ml, de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, o de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,02 mg/ml. Preferentemente, la concentración de antioxidante es de aproximadamente 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,03 mg/ml, aproximadamente 0,04 mg/ml, aproximadamente 0,05 mg/ml, aproximadamente 0,06 mg/ml, aproximadamente 0,07 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,09 mg/ml, aproximadamente 0,10 mg/ml, 0,11 mg/ml, 0,12 mg/ml, 0,13 mg/ml, aproximadamente 0,14 mg/ml, aproximadamente 0,15 mg/ml, aproximadamente 0,16 mg/ml, aproximadamente 0,17 mg/ml, 0,18 mg/ml, 0,19 mg/ml, aproximadamente 0,20 mg/ml, aproximadamente 0,25 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1,0 mg/ml. Más preferentemente, la concentración de antioxidante es de aproximadamente 0,01 mg/ml.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente invención, la composición líquida puede comprender además un conservante. Preferentemente, el agente conservante se selecciona de Fenol, m-cresol, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, cloruro de benzalconio, fenoxietanol y metil parabeno.

La concentración de conservante varía generalmente de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 0,005 mg/ml a aproximadamente 15,0 mg/ml, de aproximadamente 0,008 mg/ml a aproximadamente 12,0 mg/ml o de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml. Preferentemente, la concentración de conservante puede ser de aproximadamente 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, aproximadamente 0,4 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 0,6 mg/ml, aproximadamente 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, aproximadamente 1,0 mg/ml, 2,0 mg/ml, 3,0 mg/ml, aproximadamente 4,0 mg/ml, aproximadamente 5,0 mg/ml, aproximadamente 6,0 mg/ml, aproximadamente 7,0 mg/ml, 8,0 mg/ml, 9,0 mg/ml, aproximadamente 9,1 mg/ml, aproximadamente 9,2 mg/ml, 9,3 mg/ml, 9,4 mg/ml, 9,5 mg/ml, 9,6 mg/ml, 9,7 mg/ml, 9,8 mg/ml, 9,9 mg/ml, 10,0 mg/ml. Más preferentemente, la concentración de conservante es de aproximadamente 0,1 mg/ml o 9,0 mg/ml.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, la formulación líquida no contiene un antioxidante.

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, la formulación líquida no contiene un conservante.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la concentración de anticuerpo puede variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 mg/ml. Preferentemente, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 2,5 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 3,5 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 4,5 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 5,5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 6,5 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 7,5 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 8,5 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 9,5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 11 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 13 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml, aproximadamente 23 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 26 mg/ml, aproximadamente 27 mg/ml, aproximadamente 28 mg/ml, aproximadamente 29 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 31 mg/ml, aproximadamente 32 mg/ml, aproximadamente 33 mg/ml, aproximadamente 34 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 36 mg/ml, aproximadamente 37 mg/ml, aproximadamente 38 mg/ml, aproximadamente 39 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 41 mg/ml, aproximadamente 42 mg/ml, aproximadamente 43 mg/ml, aproximadamente 44 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 46 mg/ml, aproximadamente 47 mg/ml, aproximadamente 48 mg/ml, aproximadamente 49 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 51 mg/ml, aproximadamente 52 mg/ml, aproximadamente 53 mg/ml, aproximadamente 54 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 56 mg/ml, aproximadamente 57 mg/ml, aproximadamente 58 mg/ml, aproximadamente 59 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml o aproximadamente 110 mg/ml. Más preferentemente, la concentración de anticuerpo es inferior a o igual a aproximadamente 50 mg/ml y puede seleccionarse del grupo que comprende aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 2,5 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, 22 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml,

El anticuerpo se selecciona preferentemente del grupo de; anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, ScFv etc.), anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpo heteroconjugados, cadena sencilla (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de dominio), anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad necesaria, incluyendo variantes de glucosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente. El anticuerpo puede ser de origen murino, de rata, ser humano o cualquier otro origen (incluyendo anticuerpos quiméricos o humanizados). En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser humano pero más preferentemente está humanizado. Preferentemente, el anticuerpo está aislado, preferentemente además es sustancialmente puro. Cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, este conserva preferentemente las características funcionales del anticuerpo original, es decir, la unión a ligando y/o la actividad agonista o antagonista.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la región constante de cadena pesada de anticuerpo puede ser de cualquier tipo de región constante, tal como IgG, IgM, IgD, IgA e IgE; y cualquier isotipo, tal como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2.

De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo puede comprender la región constante de IgG2a de cadena pesada humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende la región constante kappa de cadena ligera humana. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante modificada, tal como una región constante que es inmunológicamente inerte, por ejemplo, que no desencadena lisis mediada por complemento o que no estimula la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). En otras realizaciones, la región constante está modificada como se describe en Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624; publicación PCT N° WO099/58572; y/o Solicitud de Patente del Reino Unido N° 9809951.8. En otras realizaciones más, el anticuerpo comprende una región constante de IgG2a de cadena pesada humana que comprende las mutaciones siguientes: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos con referencia a la secuencia de IgG2a de tipo silvestre), Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo es un anticuerpo anti-NGF que se une a NGF (tal como NGF humano) con alta afinidad. En algunas realizaciones, la alta afinidad es (a) la unión a NGF con una K_D de menos de aproximadamente 2 nM (tal como cualquiera de aproximadamente 1 nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM o menos) y/o una k_{off} más lenta de aproximadamente $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; y/o (b) la inhibición (reducción y/o bloqueo) de la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF) de cualquiera de aproximadamente 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM o menos; y/o (c) la inhibición (reducción y/o bloqueo) de la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF) de cualquiera de aproximadamente 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM o menos; y/o (d) la inhibición (reducción y/o bloqueo) de la supervivencia dependiente de NGF de rata de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF) de cualquiera de aproximadamente

150 pM, 125 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM o menos; y/o (e) la inhibición (reducción y/o bloqueo) de la supervivencia dependiente de NGF de rata de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF) de cualquiera de aproximadamente 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 10 pM, 5 pM, 4 pM, 3 pM, 2 pM, 1 pM o menos; y/o (f) y/o la unión de NGF con mayor afinidad que el receptor trkA.

En otro aspecto, los anticuerpos (a) se unen a NGF (tal como NGF humano) con una K_D de menos de aproximadamente 2 nM (tal como cualquiera de aproximadamente 1 nM, 800 pM, 600 pM, 400 pM, 200 pM, 100 pM, 90 pM, 80 pM, 70 pM, 60 pM, 50 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM o menos) y/o una k_{off} más lenta de aproximadamente $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; y/o (b) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF) de cualquiera de aproximadamente 200 pM, 150 pM, 100 pM, 80 pM, 60 pM, 40 pM, 20 pM, 10 pM o menos; y/o (c) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 (en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF) de cualquiera de aproximadamente 50 pM, 40 pM, 30 pM, 10 pM, 20 pM, 10 pM, 5 pM, 2 pM, 1 pM o menos; y/o se unen a NGF con mayor afinidad que el receptor trkA. En algunas realizaciones, los anticuerpos (a) se unen a NGF con una K_D de menos de aproximadamente 2 nM; y/o (b) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 de aproximadamente 100 pM o menos, en la que la CI50 se mide en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF; y/o (c) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 de aproximadamente 10 pM o menos, en la que la CI50 se mide en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF. En algunas realizaciones, los anticuerpos (a) se unen a NGF con una K_D de menos de aproximadamente 100 pM; y/o (b) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronal trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 de aproximadamente 20 pM o menos, en la que la CI50 se mide en presencia de aproximadamente 15 pM de NGF; y/o (c) inhiben la supervivencia dependiente de NGF humano de neuronas trigeminales E13.5 de ratón con una CI50 de aproximadamente 2 pM o menos, en la que la CI50 se mide en presencia de aproximadamente 1,5 pM de NGF.

El epítipo o epítopos que pueden unirse por el anticuerpo pueden ser continuos o discontinuos. En una realización, el anticuerpo se une esencialmente a los mismos epítopos de hNGF que un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AcM 911, AcM 912 y AcM 938, como se describe en Hongo y col., *Hybridoma*, 19: 215-227 (2000), un anticuerpo definido en el presente documento (tal como el anticuerpo E3); y/o descrito en el documento WO2005019266 (incluyendo los anticuerpos 4D4, 14D10, 6G9, 7H2, 14F11 y 4G6) o el documento WO2006131951 (incluyendo el anticuerpo Hu-aD11), el documento WO09023540 o US20090041717. En otra realización, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo de hNGF que el AcM 911. En otra realización más, el anticuerpo se une esencialmente al mismo epítipo que el AcM 909. Hongo y col., anteriormente. Por ejemplo, el epítipo puede comprender uno o más restos K32, K34 y E35 dentro de la región variable 1 (aminoácidos 23-35) de hNGF; los restos F79 y T81 dentro de la región variable 4 (aminoácidos 81-88) de hNGF; los restos H84 y K88 dentro de la región variable 4; el resto R103 entre la región variable 5 (aminoácidos 94-98) de hNGF y el extremo C-terminal (aminoácidos 111-118) de hNGF; el resto E11 dentro de la región prevariable 1 (aminoácidos 10-23) de hNGF; Y52 entre la región variable 2 (aminoácidos 40-49) de hNGF y la región variable 3 (aminoácidos 59-66) de hNGF; los restos L112 y S113 dentro del extremo C-terminal de hNGF; los restos R59 y R69 dentro de la región variable 3 de hNGF; o los restos V18, V20 y G23 dentro de la región prevariable 1 de hNGF. Además, un epítipo puede comprender una o más de la región variable 1, región variable 3, región variable 4, región variable 5, la región del extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal de hNGF. En otra realización más, el anticuerpo reduce significativamente la accesibilidad al disolvente del resto R103 de hNGF. Se entiende que aunque los epítopos descritos anteriormente se refieren a NGF humano, un experto en la materia puede alinear las estructuras de NGF humano con el NGF de otra especie e identificar probablemente homólogos de estos epítopos.

En un aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 se sustituye con N, T o S. Por comodidad en el presente documento, los términos "sustituido" o "es" en este contexto o referencia a un aminoácido se refieren a elecciones de un aminoácido o aminoácidos para una posición dada. Como es evidente, la sustitución, o elección, puede ser el aminoácido representado en una SEC ID o Figura. Los números de resto se determinan fácilmente por referencia a la SEC ID N° indicada y siguen la numeración de restos del anticuerpo.

En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V.

En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo), que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N, o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T.

En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.

- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la SEC ID N°: 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la SEC ID N°: 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R.
- En un aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 9, en la que I34 es S, L, V, A o I; y N35 es N, T o S.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; y en la que Y110 es Y, K, S, R o T.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 11, en la que Y100 es Y, L, o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R.
- En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como anticuerpos, incluyendo anticuerpos humanizados) que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la región CDR1 de la SEC ID N°: 9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; la región CDR2 de la SEC ID N°: 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y la región CDR3 de la SEC ID N°: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T. En algunas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la región CDR3 de la SEC ID N°: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, la región

variable de cadena pesada comprende la región CDR3 de la SEC ID N°: 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido (tal como un anticuerpo) comprende además una región variable de cadena ligera de anticuerpo.

En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende la región CDR1 de la SEC ID N°: 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; la región CDR2 de la SEC ID N°: 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y la
10 región CDR3 de la SEC ID N°: 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende la región CDR3 de la SEC ID N°: 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones el polipéptido (tal como un anticuerpo) comprende además una cadena pesada de anticuerpo.

En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprende (a) una región variable de cadena pesada que comprende la región CDR1 de la SEC ID N°: 9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; la región CDR2 de la SEC ID N°: 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y la región CDR3 de la SEC ID N°: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T; y (b) una región variable de
20 cadena ligera que comprende la región CDR1 de la SEC ID N°: 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; la región CDR2 de la SEC ID N°: 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y la región CDR3 de la SEC ID N°: 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R. En algunas realizaciones, la región variable de cadena ligera comprende la región CDR3 de la SEC ID N°: 14, en la que S91 es S o E; K92 es cualquier aminoácido; T93 es cualquier aminoácido; y en la que Y96 es Y o R. En algunas
25 realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la región CDR3 de la SEC ID N°: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; en la que Y110 es cualquier aminoácido. En otras realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la región CDR3 de la SEC ID N°: 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende además una cadena ligera de anticuerpo.

En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo, incluyendo el anticuerpo humanizado) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 9, en la que I34 es S, L, V A o I; y N35 es N, T o S; una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 10, en la que M50 es M, I, G, Q, S o L; A62 es A o S; y L63 es L o V; y una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 11, en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es D, N o G; en la que Y110 es Y, K, S, R o T. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 11, en la que Y100 es Y, L o R; y en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 11, en la que G98 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que G99 es G, S, A, C, V, N, D o T; en la que Y100 es Y, L o R; en la que Y101 es Y o W; en la que G103 es G, A o S; en la que T104 es T o S; en la que S105 es S, A o T; en la que Y106 es Y, R, T o M; en la que Y107 es Y o F; en la que F108 es F o W; en la que D109 es S, A, C, G, D, N, T o G; y en la que Y110 es cualquier aminoácido. En algunas realizaciones, el polipéptido (tal como un anticuerpo) comprende además una región variable de cadena ligera de anticuerpo.

50 En otro aspecto, la divulgación proporciona polipéptidos (tales como un anticuerpo) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 12, en la que S26 es S o F; D28 es D, S, A o Y; y H32 es H, N o Q; una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 13, en la que I51 es I, T, V o A; y S56 es S o T; y una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 14, en la que S91 es S o E; K92 es K, H, R o S; y en la que Y96 es Y o R.

55 De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente divulgación, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-NGF que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

- (a) una región CDR1 mostrada en la SEC ID N°: 3;
- (b) una región CDR2 mostrada en la SEC ID N°: 4; y
- (c) una región CDR3 mostrada en las SEC ID N°: 5, 11, 56, 58, 60, 62, 64.

60 De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente divulgación, el anticuerpo puede ser un anticuerpo

anti-NGF que comprende una región variable de cadena ligera que comprende:

- (a) una región CDR1 mostrada en la SEC ID N°: 6;
- (b) una región CDR2 mostrada en la SEC ID N°: 7; y
- (c) una región CDR3 mostrada en la SEC ID N°: 8, 14, 55, 57, 59, 61 o 63.

5 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-NGF que comprende una región variable de cadena pesada que comprende:

- (a) una región CDR1 mostrada en la SEC ID N°: 3;
- (b) una región CDR2 mostrada en la SEC ID N°: 4; y
- (c) una región CDR3 mostrada en la SEC ID N°: 5.

10 De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-NGF que comprende una región variable de cadena ligera que comprende:

- (a) una región CDR1 mostrada en la SEC ID N°: 6;
- (b) una región CDR2 mostrada en la SEC ID N°: 7; y
- (c) una región CDR3 mostrada en la SEC ID N°: 8.

15 El anticuerpo anti-NGF puede comprender además una región variable de cadena pesada que comprende:

- (a) una región CDR1 mostrada en la SEC ID N°: 3;
- (b) una región CDR2 mostrada en la SEC ID N°: 4; y
- (c) una región CDR3 mostrada en la SEC ID N°: 5.

20 De acuerdo con la presente divulgación el anticuerpo anti-NGF puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de cualquiera de al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y/o una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de cualquiera de al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, en la que el anticuerpo se une específicamente a NGF.

25 La región variable de cadena pesada y/o región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-NGF humanizado puede comprender una o más mutaciones de la región flanqueante respectiva. En un aspecto, la mutación de la región flanqueante puede sustituir un resto de región flanqueante humana con el resto de la región flanqueante de ratón complementario. La mutación puede comprender la sustitución V71K en la región variable de la cadena pesada.

30 De acuerdo con la presente invención el anticuerpo anti-NGF puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y/o puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

35 De acuerdo con la presente invención el anticuerpo anti-NGF comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N°: 1 y 2.

40 El anticuerpo anti-NGF puede comprender una región de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de cualquiera de al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16 y/o una región de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de cualquiera de al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17, en la que el anticuerpo se une específicamente a NGF.

El anticuerpo anti-NGF puede comprender una región de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16 y/o puede comprender una región de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17.

45 El anticuerpo anti-NGF puede ser un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N°: 16 y 17.

50 De acuerdo con la presente divulgación el anticuerpo anti-NGF puede competir por la unión a NGF con un anticuerpo anti-NGF como se define en el presente documento. El anticuerpo anti-NGF puede competir por la unión a NGF con un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 1 y/o una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

El anticuerpo anti-NGF puede ser un anticuerpo humanizado y madurado por afinidad, E3, que se une específicamente a NGF humano y de roedor. El anticuerpo E3 se describe en el documento WO2004/058184. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada de E3 se muestran en

las SEC ID N°: 1 y 2 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184), respectivamente. Las porciones CDR del anticuerpo E3 (incluyendo CDR de Chothia y Kabat) se representan en forma esquemática en las Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de E3 y de las CDR extendidas individuales también se muestran a continuación (véase, "secuencias de anticuerpo" a continuación). El anticuerpo E3 es muy potente para secuestrar NGF e impedir la interacción con su receptor. E3 y su anticuerpo precursor murino 911 han demostrado ser un analgésico eficaz en modelos animales no clínicos de dolor patológico incluyendo artritis, dolor por cáncer y dolor postquirúrgico.

El anticuerpo anti-NGF también puede comprender un fragmento o una región del anticuerpo E3 (denominados indistintamente "E3" en el presente documento). En una realización, el fragmento es una cadena ligera del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1B del documento WO2004/058184 y en la SEC ID N°: 17 en el presente documento. En otra realización, el fragmento es una cadena pesada del anticuerpo E3 como se muestra en la Figura 1A del documento WO2004/058184 y en la SEC ID N°: 16 en el presente documento. En otra realización más, el fragmento contiene una o más regiones variables de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3. En otra realización más, el fragmento contiene una o más CDR de una cadena ligera y/o una cadena pesada del anticuerpo E3, como se muestra en las Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184 y en las SEC ID N°: 17 y 16, respectivamente, en el presente documento.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de la ATCC N° PTA-4893 o ATCC N° PTA-4894. En otro aspecto, el anticuerpo comprende una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de la ATCC N° PTA-4895. En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de la ATCC N° PTA-4894 o ATCC N° PTA-4893; y (b) una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de la ATCC N° PTA-4895 (por comodidad en el presente documento, el polinucleótido o polinucleótidos producidos por una célula huésped depositada se denominan con el número de depósito de la ATCC N° PTA-4894, PTA-4893 y PTA-4895). En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de la ATCC N° PTA-4894 o ATCC N° PTA-4893. En otro aspecto, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de la ATCC N° PTA-4895. En otro aspecto, el anticuerpo comprende (a) una región variable de cadena ligera de una cadena ligera que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de la ATCC N° PTA-4894 o ATCC N° PTA-4893, y (b) una región variable de cadena pesada de una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de la ATCC N° PTA-4895. En otro aspecto más, el anticuerpo comprende una o más CDR codificadas por (a) un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de la ATCC N° PTA-4894; y/o (b) una cadena pesada que está codificada por un polinucleótido que se produce por una célula huésped con un número de depósito de la ATCC N° PTA-4895.

En otro aspecto, el anticuerpo comprende una o más de cualquiera de las siguientes: a) una o más CDR de anticuerpo E3 mostradas en las SEC ID N°: 1-8 o SEC ID N°: 3-8 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184); b) la CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrada en las SEC ID N°: 1 y 5 (Figura 1A del documento WO2004/058184); c) la CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrada en las SEC ID N°: 2 y 8 (Figura 1B del documento WO2004/058184); d) tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostradas en las SEC ID N°: 2, 6-8 (Figura 1B del documento WO2004/058184); e) tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostradas en las SEC ID N°: 1, 3-5 (Figura 1A del documento WO2004/058184); y f) tres CDR de la cadena ligera y tres CDR de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostradas en las SEC ID N°: 1-8 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184). En otro aspecto, el anticuerpo puede comprender una o más de cualquiera de las siguientes: a) una o más (una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR derivadas del anticuerpo E3 mostradas en las SEC ID N°: 1-8 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184); b) una CDR derivada de la CDR H3 de la cadena pesada del anticuerpo E3 mostrada en las SEC ID N°: 1 y 5 (Figura 1A del documento WO2004/058184); y/o c) una CDR derivada de la CDR L3 de la cadena ligera del anticuerpo E3 mostrada en las SEC ID N°: 2 y 8 (Figura 1B del documento WO2004/058184). En algunas realizaciones, las CDR pueden ser CDR de Kabat, CDR de Chothia o una combinación de CDR de Kabat y Chothia (denominadas CDR "extendidas" o "combinadas" en el presente documento). En algunas realizaciones, los polipéptidos comprenden cualquiera de las configuraciones de CDR (incluyendo combinaciones, variantes, etc.) descritas en el presente documento.

En otra divulgación, el anticuerpo puede comprender:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende:

(i) una región CDR1 de la SEC ID N°: 30;

(ii) una región CDR2 que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 31;

(iii) una región CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 11, 56, 58, 60, 62 y 64; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende:

- (i) una región CDR1 de la SEC ID N°: 18;
- (ii) una región CDR2 de la SEC ID N°: 19;
- (iii) una región CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID N°: 14, 55, 57, 59, 61 y 63.

5 En algunas realizaciones de la presente invención, se deleta la lisina C-terminal de la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos anti-NGF descritos en el presente documento. En diversos casos la cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos anti-NGF descritos en la presente memoria puede incluir opcionalmente una secuencia señal.

10 En otra divulgación, el anticuerpo puede seleccionarse de un anticuerpo anti-NGF conocido en la técnica, tal como los anticuerpos descritos en el documento WO2005019266 (incluyendo los anticuerpos 4D4, 14D10, 6G9, 7H2, 14F11 y 4G6), el documento WO2006131951 (incluyendo el anticuerpo Hu- α D11), los documentos WO09023540 o US20090041417. Como se desvela en el presente documento el anticuerpo puede unirse al mismo epítipo que un anticuerpo anti-NGF conocido en la técnica, tal como AcM 911, AcM 912 y AcM 938, como se describe en Hongo y col., Hybridoma, 19: 215-227 (2000), y los anticuerpos descritos en el documento WO2005019266 (incluyendo los anticuerpos 4D4, 14D10, 6G9, 7H2, 14F11 y 4G6), el documento WO2006131951 (incluyendo el anticuerpo Hu- α D11), los documentos WO09023540 o US20090041417, y/o puede competir por la unión a NGF con dicho anticuerpo.

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención la composición líquida comprende o consiste en; de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml de al menos un anticuerpo, de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 15 mM de tampón de histidina, 20 de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml de trehalosa dihidrato, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,15 mg/ml de PS20, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/ml de EDTA disódico, en la que el pH de dicha composición es un pH de 5,8 a 6,8.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención la composición líquida comprende o consiste en; cualquiera de aproximadamente 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 22 mg/ml o aproximadamente 50 mg/ml de al menos un anticuerpo, de aproximadamente 1,0 mM a aproximadamente 15 mM de tampón de histidina, de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml de trehalosa dihidrato, 30 de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,15 mg/ml de PS20, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/ml de EDTA disódico, en la que el pH de dicha composición es de pH 5,8 a 6,8.

35 De acuerdo con una realización preferida, la composición líquida comprende o consiste en; cualquiera de aproximadamente 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 22 mg/ml o aproximadamente 50 mg/ml de al menos un anticuerpo, aproximadamente 10 mM de tampón de histidina, aproximadamente 84 mg/ml de trehalosa dihidrato, aproximadamente 0,1 mg/ml de PS20, aproximadamente 0,05 mg/ml de EDTA disódico, 40 en la que el pH de dicha composición es de pH 5,8 a 6,8, preferentemente es de un pH de 5,8 a 6,5, y en la que dicho anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada variable de SEC ID N°: 1 y una secuencia de cadena ligera variable de SEC ID N°: 2,

45 De acuerdo con una realización preferida, la composición líquida comprende o consiste en; cualquiera de aproximadamente 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 22 mg/ml o aproximadamente 50 mg/ml de al menos un anticuerpo, aproximadamente 10 mM de tampón de histidina, aproximadamente 84 mg/ml de trehalosa dihidrato, aproximadamente 0,1 mg/ml de PS20, aproximadamente 0,05 mg/ml de EDTA disódico, 50 en la que dicha composición es de un pH de 6,0, +/- 0,2 y en la que dicho anticuerpo comprende una secuencia de cadena pesada variable de SEC ID N°: 1 y una secuencia de cadena ligera variable de SEC ID N°: 2. En una realización preferida, el volumen de dosis usado es de 1 ml.

En un aspecto, se proporciona una composición líquida que no está liofilizada y que no se ha sometido a liofilización.

55 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición líquida de la invención en la que la composición es resistente a la agregación del anticuerpo después de múltiples ciclos de congelación y descongelación.

Preferentemente, el anticuerpo es resistente a la agregación durante al menos un ciclo de congelación y descongelación de la composición, preferentemente además en el que el anticuerpo es resistente a la agregación durante múltiples ciclos de congelación y descongelación, preferentemente durante al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

11, 12, 13, 14 o 15 ciclos de congelación-descongelación. Más preferentemente, el anticuerpo es resistente a la agregación durante al menos quince ciclos de congelación y descongelación de la composición líquida, preferentemente además cuatro o quince ciclos.

Preferentemente además, el anticuerpo demuestra un aumento de la agregación de menos de aproximadamente el 10% después de los múltiples ciclos de congelación y descongelación de la composición líquida en comparación con la misma composición, o una muestra equivalente de idéntica o aproximadamente idéntica composición, antes de la congelación y descongelación, más preferentemente un aumento de la agregación de menos de o aproximadamente el 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 o 0% después de los múltiples ciclos de congelación y descongelación de la composición líquida en comparación con la misma composición, o una muestra equivalente de idéntica o aproximadamente idéntica composición, antes de la congelación y descongelación.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición líquida de la invención en la que la composición puede almacenarse durante un periodo de al menos aproximadamente 26 o 52 semanas a una temperatura de cualquiera de aproximadamente 5, 25 o 40°C, y en la que existe un aumento en la agregación del anticuerpo de la composición de menos de aproximadamente el 35%, más preferentemente menos de aproximadamente el 10%. Preferentemente, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml o de aproximadamente 50 mg/ml.

Preferentemente, existe un aumento en la agregación del anticuerpo de la formulación líquida de menos de aproximadamente el 35%, más preferentemente menos de aproximadamente el 10%, cuando se almacena durante un periodo de cualquiera de aproximadamente 2, 4, 8, 9, 13, 26 o 52 semanas a una temperatura de cualquiera de aproximadamente 5, 25 o 40°C en comparación con la misma composición, o una muestra equivalente de idéntica o aproximadamente idéntica composición, antes del periodo de almacenamiento. Preferentemente, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml o de aproximadamente 50 mg/ml.

Más preferentemente, el anticuerpo de la composición líquida demuestra un aumento de la agregación de menos de aproximadamente el 35%, más preferentemente menos de aproximadamente el 10%, más preferentemente menos de cualquiera de aproximadamente el 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, más preferentemente menos de aproximadamente el 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0,5% o igual a aproximadamente el 0% después del periodo de almacenamiento de 2, 4, 8, 9, 13, 26 o 52 semanas a una temperatura de cualquiera de aproximadamente 5, 25 o 40°C, más preferentemente, menos de aproximadamente el 20% a 40°C durante 52 semanas, o menos de aproximadamente el 10% a 40°C durante 26 semanas, en comparación con la misma composición, o una muestra equivalente de idéntica o aproximadamente idéntica composición, antes del periodo de almacenamiento. Preferentemente, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml o de aproximadamente 50 mg/ml.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición líquida de la invención en la que la composición puede almacenarse durante un periodo de al menos aproximadamente 26 o 52 semanas a una temperatura de cualquiera de aproximadamente 5, 25 o 40°C, y en la que existe un aumento en la oxidación del anticuerpo de la composición de menos de aproximadamente el 35%, más preferentemente menos de aproximadamente el 10%, en comparación con la misma composición, o una muestra equivalente de idéntica o aproximadamente idéntica composición, antes del periodo de almacenamiento. Preferentemente, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml o de aproximadamente 50 mg/ml.

Preferentemente, el anticuerpo de la composición líquida demuestra un aumento de la oxidación de menos de aproximadamente el 35%, más preferentemente menos de aproximadamente el 10%, más preferentemente menos de cualquiera de aproximadamente el 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, más preferentemente menos de aproximadamente el 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0,5%, o igual a aproximadamente el 0%, después del periodo de almacenamiento de cualquiera de aproximadamente 2, 4, 8, 9, 13, 26 o 52 semanas a una temperatura de cualquiera de aproximadamente 5, 25 o 40°C, más preferentemente, menos de aproximadamente el 31% o 30% durante 52 semanas, o menos de aproximadamente el 11% o 10% a 40°C durante 26 semanas, en comparación con la misma composición, o una muestra equivalente de idéntica o aproximadamente idéntica composición, antes del periodo de almacenamiento. Preferentemente, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml o de aproximadamente 50 mg/ml.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición líquida de la invención en la que la composición puede almacenarse durante un periodo de al menos aproximadamente 26 o 52 semanas a una temperatura de cualquiera de aproximadamente 5, 25 o 40°C, y en la que existe una disminución en la actividad del anticuerpo de la composición de menos del 30%.

Preferentemente, existe una disminución en la actividad del anticuerpo de la formulación líquida de menos de aproximadamente el 30%, más preferentemente de menos de aproximadamente el 25%, más preferentemente del 20%, más preferentemente una disminución en la actividad del anticuerpo de la formulación de menos de aproximadamente el 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 o 0% cuando se almacena

durante un periodo de cualquiera de al menos aproximadamente 2, 4, 8, 9, 13 o 26 semanas a una temperatura de cualquiera de aproximadamente 5, 25 o 40°C en comparación con la misma composición, o una muestra equivalente de idéntica o aproximadamente idéntica composición, antes del periodo de almacenamiento. Preferentemente, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml o de aproximadamente 50 mg/ml.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición líquida de la invención en la que la composición puede almacenarse durante un periodo de al menos aproximadamente 26 semanas a una temperatura de cualquiera de aproximadamente 5, 25 o 40°C, y en la que existe un aumento en la fragmentación del anticuerpo de la composición de menos de aproximadamente el 15% en comparación con la misma composición, o una muestra equivalente de idéntica o aproximadamente idéntica composición, antes del
10 periodo de almacenamiento, preferentemente en la que la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml o de aproximadamente 50 mg/ml. Preferentemente, el anticuerpo de la composición líquida demuestra un aumento de la fragmentación de menos de aproximadamente el 15%, más preferentemente menos de cualquiera de aproximadamente el 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% o 0,5% o igual a aproximadamente el 0%, después del periodo de almacenamiento de cualquiera de aproximadamente 2, 4, 8, 9, 13
15 o 26 semanas a una temperatura de cualquiera de aproximadamente 5, 25 o 40°C, más preferentemente menos de aproximadamente el 14% a aproximadamente 40°C durante aproximadamente 26 semanas, en comparación con la misma composición, o una muestra equivalente de idéntica o aproximadamente idéntica composición, antes del periodo de almacenamiento. Preferentemente, la concentración del anticuerpo es de aproximadamente 10 mg/ml o de aproximadamente 50 mg/ml.

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición líquida de la invención en la que la composición puede almacenarse durante un periodo de al menos aproximadamente 52 semanas a una temperatura de entre 2 y 8°C, preferentemente 5°C, en la que existe una disminución de menos del 20% en la actividad del anticuerpo de la composición. Preferentemente, la concentración de anticuerpo es cualquiera de aproximadamente 2,5, 5, 10, 20 o 50 mg/ml.

25 Preferentemente, existe un aumento en la agregación del anticuerpo de la formulación líquida de menos de aproximadamente el 15%, más preferentemente de menos de aproximadamente el 10%, cuando se almacena durante un periodo de cualquiera de al menos aproximadamente 2, 4, 8, 13, 26 o 52 semanas, preferentemente además cualquiera de al menos aproximadamente 2, 3, 6, 9, 12, 18 o 24 meses, a una temperatura de aproximadamente 2 a 8°C, preferentemente 5°C, en comparación con la misma composición, una muestra
30 equivalente de idéntica o aproximadamente idéntica composición, antes del periodo de almacenamiento. Preferentemente, la concentración de anticuerpo es cualquiera de aproximadamente 2,5, 5, 10, 20 o 50 mg/ml.

Más preferentemente el anticuerpo de la composición líquida demuestra un aumento de la agregación de menos de aproximadamente el 15%, más preferentemente de menos de aproximadamente el 10%, más preferentemente un aumento de la agregación de menos de aproximadamente el 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 o 0% después del periodo de
35 almacenamiento en comparación con la misma composición, o una muestra equivalente de idéntica o aproximadamente idéntica composición, antes del periodo de almacenamiento.

De acuerdo con un aspecto adicional preferido de la presente invención, se proporciona una composición líquida de acuerdo con cualquier aspecto o realización anterior, para su uso en el tratamiento del dolor en un mamífero.
40 Preferentemente, el dolor se selecciona de uno o más de dolor agudo, dolor crónico, dolor neuropático, inflamatorio, nociceptivo, de etiología mixta, hiperalgesia, alodinia, dolor visceral, dolor somático y dolor de espalda.

De acuerdo con otra realización más de la divulgación, se proporciona una composición líquida de acuerdo con cualquier aspecto o realización anterior, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor y/o de síntomas del tracto urinario inferior (TUI) asociados con cistitis intersticial y/o síndrome de vejiga dolorosa y/o
45 síndrome de dolor de vejiga.

De acuerdo con otra realización más de la divulgación, se proporciona una composición líquida de acuerdo con cualquier aspecto o realización anterior, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del dolor y/o de la prostatitis crónica y/o del síndrome de dolor pélvico crónico. De acuerdo con otra divulgación, se proporciona una composición líquida de acuerdo con cualquier aspecto o realización anterior, para la fabricación de un medicamento
50 para el tratamiento del dolor y/o otros síntomas asociados con endometriosis y/o fibroides uterinos.

Preferentemente, el mamífero se selecciona de roedores (tales como ratones, ratas y conejos), mascotas (tales como gatos, perros y caballos), animales de granja (tales como vacas, ovejas, cerdos y cabras), animales deportivos y/o mascotas (tales como gatos, perros y caballos), primates, más preferentemente un ser humano.

De acuerdo con una realización preferida, la composición líquida puede administrarse directamente en el torrente sanguíneo, en músculo, en tejido, en grasa o en un órgano interno. Los medios adecuados para su administración
55 parenteral incluyen por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular, intraósea, intradérmica y subcutánea. Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen inyectores con aguja (incluyendo microaguja, microproyecciones, agujas solubles y otras técnicas de formación de microporos), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

En algunas realizaciones, el patrón de administración del medicamento comprende la administración de una dosis del medicamento una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas, una vez cada ocho semanas, una vez cada nueve semanas, una vez cada diez semanas, una vez cada quince semanas, una vez cada veinte semanas, una vez cada veinticinco semanas o una vez cada veintiséis semanas. En algunas realizaciones, el anticuerpo antagonista anti-NGF se administra una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, una vez cada cuatro meses, una vez cada cinco meses o una vez cada seis meses. Más preferentemente, en el patrón de administración del medicamento comprende la administración de una dosis del medicamento una vez cada ocho semanas.

En algunas realizaciones, el volumen de una dosis es inferior a o igual a aproximadamente 20 ml, aproximadamente 15 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 2,5 ml, aproximadamente 1,5 ml, aproximadamente 1,0 ml, aproximadamente 0,75 ml, aproximadamente 0,5 ml, aproximadamente 0,25 ml o aproximadamente 0,01 ml. En algunas realizaciones, el volumen de una dosis es de aproximadamente 20 ml, aproximadamente 19 ml, aproximadamente 18 ml, aproximadamente 17 ml, aproximadamente 16 ml, aproximadamente 15 ml, aproximadamente 14 ml, aproximadamente 13 ml, aproximadamente 12 ml, aproximadamente 11 ml, aproximadamente 10 ml, aproximadamente 9 ml, aproximadamente 8 ml, aproximadamente 7 ml, aproximadamente 6 ml, aproximadamente 5 ml, aproximadamente 4 ml, aproximadamente 3 ml, aproximadamente 2 ml o aproximadamente 1 ml. Como alternativa, de aproximadamente 20,5 ml, aproximadamente 19,5 ml, aproximadamente 18,5 ml, aproximadamente 17,5 ml, aproximadamente 16,5 ml, aproximadamente 15,5 ml, aproximadamente 14,5 ml, aproximadamente 13,5 ml, aproximadamente 12,5 ml, aproximadamente 11,5 ml, aproximadamente 10,5 ml, aproximadamente 9,5 ml, aproximadamente 8,5 ml, aproximadamente 7,5 ml, aproximadamente 6,5 ml, aproximadamente 5,5 ml, aproximadamente 4,5 ml, aproximadamente 3,5 ml, aproximadamente 2,5 ml, aproximadamente 1,5 ml o aproximadamente 0,5. Como alternativa, de aproximadamente 900 microlitros, aproximadamente 800 microlitros, aproximadamente 700 microlitros, aproximadamente 600 microlitros, aproximadamente 500 microlitros, aproximadamente 400 microlitros, aproximadamente 300 microlitros, aproximadamente 200 microlitros o aproximadamente 100 microlitros, como alternativa, de aproximadamente 950 microlitros, aproximadamente 850 microlitros, aproximadamente 750 microlitros, aproximadamente 650 microlitros, aproximadamente 550 microlitros, aproximadamente 450 microlitros, aproximadamente 350 microlitros, aproximadamente 250 microlitros, aproximadamente 150 microlitros o aproximadamente 50 microlitros. Más preferentemente, el volumen de la dosis es inferior a o igual a aproximadamente 2,5 ml.

De acuerdo con una realización preferida, la concentración de anticuerpo puede variar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 mg/ml. Preferentemente, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 2,5 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 3,5 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 4,5 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 5,5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 6,5 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 7,5 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 8,5 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 9,5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 11 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 13 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml, aproximadamente 23 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 26 mg/ml, aproximadamente 27 mg/ml, aproximadamente 28 mg/ml, aproximadamente 29 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 31 mg/ml, aproximadamente 32 mg/ml, aproximadamente 33 mg/ml, aproximadamente 34 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 36 mg/ml, aproximadamente 37 mg/ml, aproximadamente 38 mg/ml, aproximadamente 39 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 41 mg/ml, aproximadamente 42 mg/ml, aproximadamente 43 mg/ml, aproximadamente 44 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 46 mg/ml, aproximadamente 47 mg/ml, aproximadamente 48 mg/ml, aproximadamente 49 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 51 mg/ml, aproximadamente 52 mg/ml, aproximadamente 53 mg/ml, aproximadamente 54 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 56 mg/ml, aproximadamente 57 mg/ml, aproximadamente 58 mg/ml, aproximadamente 59 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml o aproximadamente 110 mg/ml. Más preferentemente, la concentración de anticuerpo es inferior a o igual a 50 mg/ml y puede seleccionarse del grupo que comprende aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 2,5 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml.

De acuerdo con una realización preferida, la dosis contiene menos de o es igual a aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 11 mg, aproximadamente 12 mg, aproximadamente 13 mg, aproximadamente 14 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 16 mg, aproximadamente 17 mg, aproximadamente 18 mg, aproximadamente 19 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 21 mg, aproximadamente 22 mg, aproximadamente 23 mg, aproximadamente 24 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 26 mg, aproximadamente 27 mg, aproximadamente 28 mg,

aproximadamente 29 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 31 mg, aproximadamente 32 mg, aproximadamente 33 mg, aproximadamente 34 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 36 mg, aproximadamente 37 mg, aproximadamente 38 mg, aproximadamente 39 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 41 mg, aproximadamente 42 mg, aproximadamente 43 mg, aproximadamente 44 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 46 mg, aproximadamente 47 mg, aproximadamente 48 mg, aproximadamente 49 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 51 mg, aproximadamente 52 mg, aproximadamente 53 mg, aproximadamente 54 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 56 mg, aproximadamente 57 mg, aproximadamente 58 mg, aproximadamente 59 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 100 mg o aproximadamente 110 mg de anticuerpo. Más preferentemente la dosis contiene menos de o es igual a aproximadamente 50 mg de anticuerpo.

De acuerdo con una realización preferida, la dosis contiene una cantidad de anticuerpo que es de aproximadamente 1 µg/kg, aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 20 µg/kg, aproximadamente 25 µg/kg, aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 200 µg/kg, aproximadamente 250 µg/kg, aproximadamente 500 µg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg o aproximadamente 11 mg/kg (de masa del mamífero al que se va a administrar la dosis). Más preferentemente, la dosis contiene aproximadamente 20 µg/kg, aproximadamente 25 µg/kg, aproximadamente 50 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg, aproximadamente 200 µg/kg, aproximadamente 250 µg/kg, 1 mg/kg o aproximadamente 2 mg/kg.

Los regímenes de dosificación pueden depender del patrón de declive farmacocinético que desee conseguir el médico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se contempla una dosificación de una-cuatro veces por semana. Puede usarse una dosificación aún menos frecuente. En algunas realizaciones, la dosis se administra una vez 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 o más tiempo. En algunas realizaciones, la dosis se administra 1 vez al mes, cada 2 meses, cada 3 meses, cada 4 meses, cada 5 meses, cada 6 meses o más tiempo. Más preferentemente, la dosis se administra una vez cada ocho semanas. El progreso de esta terapia se controla fácilmente por técnicas y ensayos convencionales. El régimen de dosificación puede variar con el tiempo.

Para los fines de la presente invención, la dosificación apropiada del medicamento dependerá del anticuerpo empleado, del tipo y gravedad del dolor a tratar, de si el agente se administra con fines terapéuticos o preventivos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y de la respuesta al agente, y del juicio del médico adjunto. Típicamente, el clínico administrará el medicamento hasta que se alcance una dosificación que consiga el resultado deseado. Las dosificaciones pueden determinarse empíricamente, por ejemplo, se administra a individuos dosificaciones crecientes para evaluar la eficacia del medicamento, puede seguirse un indicador de dolor, tal como un cambio en una escala de calificación numérica del dolor (ECN).

La dosis y/o frecuencia pueden variar con el transcurso del tratamiento. Consideraciones empíricas tales como la semivida del anticuerpo contribuirán generalmente a la determinación de la dosificación. La frecuencia de dosificación puede determinarse y ajustarse con el transcurso de la terapia y, generalmente, pero no necesariamente, se basa en el tratamiento y/o supresión y/o mejoría y/o retraso del dolor. En algunos individuos, puede ser necesaria más de una dosis. La frecuencia de administración puede determinarse y ajustarse con el transcurso de la terapia. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más tiempo, dependiendo del dolor y de su gravedad, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la supresión de síntomas deseada o hasta que se consiguen niveles terapéuticos suficientes para reducir el dolor.

La administración de un medicamento que comprende la composición líquida puede ser continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del receptor, de si el propósito de la administración es terapéutico o profiláctico y de otros factores conocidos por los expertos en la materia. La administración del medicamento que comprende la composición líquida puede ser esencialmente continua a lo largo de un periodo de tiempo preseleccionado o puede ser una serie de dosis espaciadas, por ejemplo, antes, durante o después del desarrollo del dolor.

Preferentemente, la administración de la dosis es una administración parenteral, preferentemente seleccionada de intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular, intraósea, intradérmica y subcutánea. Preferentemente, el medicamento está en una forma líquida estéril de dosificación unitaria para su administración parenteral.

La eficacia del tratamiento puede evaluarse por control del alivio del dolor. El alivio del dolor puede caracterizarse por el curso de tiempo de alivio. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se observa alivio en aproximadamente 24 horas después de la administración. En otras realizaciones, se observa alivio en aproximadamente 36, 48, 60, 72 horas o 4 días después de la administración. En algunas realizaciones, se disminuye la frecuencia y/o intensidad del dolor y/o se aumenta la calidad de vida de aquellos que padecen dolor. En algunas realizaciones, se proporciona alivio del dolor por una duración de al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 14 días, al

menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 28 días, al menos aproximadamente 35 días, al menos aproximadamente 42 días, al menos aproximadamente 49 días, al menos aproximadamente 56 días, al menos aproximadamente 63 días, al menos aproximadamente 70 días, al menos aproximadamente 77 días, al menos aproximadamente 84 días, al menos aproximadamente 180 días o más tiempo después de una sola dosis del medicamento.

COMBINACIONES

La composición líquida de acuerdo con cualquier aspecto o realización puede combinarse provechosamente con otro compuesto farmacológicamente activo, o con dos o más compuestos farmacológicamente activos distintos, particularmente en el tratamiento del dolor en un mamífero, y puede administrarse simultáneamente, de forma secuencial o por separado en combinación con uno o más agentes seleccionados de:

- (i) un analgésico opioide, por ejemplo, morfina, heroína, hidromorfona, oximorfona, levorfanol, levalorfanol, metadona, meperidina, fentanilo, cocaína, codeína, dihidrocodeína, oxicodona, hidrocodona, propoxifeno, nalmefeno, nalorfina, naloxona, naltrexona, buprenorfina, butorfanol, nalbufina o pentazocina;
- (ii) un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), por ejemplo, aspirina, diclofenaco, diflusinal, etodolaco, fenbufén, fenoprofeno, flufenisal, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tolmetina o zomepiraco, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (iii) un sedante barbitúrico, por ejemplo, amobarbital, aprobarbital, butabarbital, butabital, mefobarbital, metarbital, metohexital, pentobarbital, fenobarbital, secobarbital, talbutal, teamilal o tiopental o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (iv) una benzodiazepina que tiene una acción sedante, por ejemplo, clordiazepóxido, clorazepato, diazepam, flurazepam, lorazepam, oxazepam, temazepam o triazolam, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (v) un antagonista de H₁ que tiene una acción sedante, por ejemplo, difenhidramina, pirlamina, prometazina, clorfeniramina o clorciclizina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (vi) un sedante tal como glutetimida, meprobamato, metacualona o dicloralfenazona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (vii) un relajante del músculo esquelético, por ejemplo, baclofeno, carisoprodol, cloroxazona, ciclobenzaprina, metocarbamol u orfenadina o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (viii) un antagonista de receptor de NMDA, por ejemplo, dextrometorfano ((+)-3-hidroxi-N-metilmorfinano) o su metabolito dextrotrorfano ((+)-3-hidroxi-N-metilmorfinano), ketamina, memantina, pirroloquinolina quinona o ácido cis-4-(fosfonometil)-2-piperidinecarboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- (ix) un alfa-adrenérgico, por ejemplo, doxazosina, tamsulosina, clonidina o 4-amino-6,7-dimetoxi-2-(5-metanesulfonamido)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinol-2-il)-5-(2-piridil)quinazolina;
- (x) un antidepresivo tricíclico, por ejemplo, desipramina, imipramina, amitriptilina o nortriptilina;
- (xi) un anticonvulsivo, por ejemplo, carbamazepina o valproato;
- (xii) un antagonista de taquiquinina (NK), particularmente un antagonista de NK-3, NK-2 o NK-1, por ejemplo, (α R,9R)-7-[3,5-bis(trifluorometil)encil]-8,9,10,11-tetrahidro-9-metil-5-(4-metilfenil)-7H-[1,4]diazocino[2,1-g][1,7]naftiridin-6-13-diona (TAK-637), 5-[[[(2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-bis(trifluorometil)fenil]etoxi-3-(4-fluorofenil)-4-morfolinil]metil]-1,2-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-ona (MK-869), lanepitant, dapitant o 3-[[2-metoxi-5-(trifluorometoxi)fenil]metilamino]-2-fenil-piperidina (2S,3S);
- (xiii) un antagonista muscarínico, por ejemplo, oxibutina, tolterodina, propiverina, cloruro de tropisio o darifenacina;
- (xiv) un inhibidor de COX-2, por ejemplo, celecoxib, rofecoxib o valdecoxib;
- (xv) un inhibidor de COX no selectivo (preferentemente con protección GI), por ejemplo, nitroflurbiprofeno (HCT-1026);
- (xvi) un analgésico de alquitrán de hulla, en particular paracetamol;
- (xvii) un neuroléptico tal como droperidol;
- (xviii) un agonista (por ejemplo, resinferatoxina) o antagonista (por ejemplo, capsazepina) del receptor vaniloide;
- (xix) un beta-adrenérgico tal como propranolol;
- (xx) un anestésico local, tal como mexiletina;
- (xxi) un corticosteroide, tal como dexametasona
- (xxii) un agonista o antagonista del receptor de serotonina;
- (xxiii) un analgésico colinérgico (nicotínico);
- (xxiv) Tramadol (marca comercial);
- (xxv) un inhibidor de PDEV, tal como sildenafil, vardenafil o taladafil;
- (xxvi) un ligando alfa-2-delta tal como gabapentina o pregabalina; y
- (xxvii) un canabinoide.

Descripción de las figuras

Figura 1 Resumen de los Datos de % de Agregación (mediante CET) de anticuerpo anti-NGF 50 mg/ml: Estudio de Exploración de Agente de Tonicidad a 40°C.

Figura 2 Resumen de los Datos de % de Fragmentos (mediante ECG reducido) de anticuerpo anti-NGF 50

mg/ml: Estudio de Exploración de Agente de Tonicidad a 40°C.

Figura 3 Resumen de los Datos de % de Agregación (mediante CET) de anticuerpo anti-NGF 22 mg/ml sometido a 15 Ciclos de Congelación-Descongelación.

5 **Figura 4** Datos de % de Agregación (mediante CET) a 5°C durante un Estudio de Estabilidad a Largo Plazo de una formulación de anticuerpo anti-NGF E3 que contiene trehalosa, EDTA, polisorbato 20 en tampón de histidina a pH 6,0 a 2,5, 5, 10, 20 y 50 mg/ml

Figura 5 Datos de % de Fragmentación (mediante ECG reducido) a 5°C durante un Estudio de Estabilidad a Largo Plazo de una formulación de anticuerpo anti-NGF E3 que contiene trehalosa, EDTA, polisorbato 20 en tampón de histidina a pH 6,0 a 2,5, 5, 10, 20 y 50 mg/ml

10 **Figura 6** Datos de % de Oxidación a 5°C durante un Estudio de Estabilidad a Largo Plazo de una formulación de anticuerpo anti-NGF E3 que contiene trehalosa, EDTA, polisorbato 20 en tampón de histidina a pH 6,0 a 2,5, 5, 10, 20 y 50 mg/ml.

Definiciones

15 Como se usan en el presente documento, los términos “formulación” o “composición” en lo que se refieren a un anticuerpo pretenden describir al anticuerpo en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, que comprende al menos un agente de tonicidad, al menos un tampón, al menos un agente quelante, al menos un tensioactivo, en la que el pH es como se ha definido.

La expresión “composición farmacéutica” se refiere a preparaciones que están en una forma tal que permite que la actividad biológica de los principios activos sea eficaz.

20 Los “excipientes farmacéuticamente aceptables” (vehículos, aditivos) son aquellos que pueden administrarse con seguridad a un sujeto para proporcionar una dosis eficaz del principio activo empleado. El término “excipiente” o “vehículo”, como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia inerte, que se usa comúnmente como diluyente, vehículo, conservante, aglutinante o agente estabilizante para fármacos. Como se usa en el presente documento, el término “diluyente” se refiere a un disolvente farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para su administración a un ser humano) y que es útil para la preparación de las formulaciones líquidas del presente documento. Los diluyentes ejemplares incluyen, pero sin limitación, agua estéril y agua bacteriostática para inyección (ABPI).

30 Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a un anticuerpo intacto o a una porción de unión a antígeno que compite con el anticuerpo intacto por una unión específica. Véase, en general, Fundamental Immunology, Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989). Pueden producirse porciones de unión a antígeno mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. En algunas realizaciones, las porciones de unión a antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, y fragmentos de región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos y polipéptidos que contienen al menos una porción de un anticuerpo que es suficiente para conferir una unión a antígeno específica al polipéptido. Del extremo N-terminal al C-terminal, ambos dominios variables de cadena pesada y ligera maduros comprenden las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) o Chothia y col., Nature 342: 878-883 (1989). Como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” incluye proteínas artificiales o nativas, fragmentos proteicos y análogos polipeptídicos de una secuencia proteica. Un polipéptido puede ser monomérico o polimérico.

Como se usa en el presente documento, un fragmento Fd se refiere a un fragmento de anticuerpo que consiste en los dominios V_H y CH1; un fragmento Fv consiste en los dominios V₁ y VH de un solo brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb (Ward y col., Nature 341: 544-546 (1989)) consiste en un dominio V_H.

45 La expresión “o una porción de unión a antígeno del mismo”, cuando se usa con el término “anticuerpo”, se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural. En algunas realizaciones, los fragmentos tienen al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud. En otras realizaciones, los fragmentos tienen al menos 14, al menos 20, al menos 50 o al menos 70, 80, 90, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo monoclonal” se refiere a una población de anticuerpo homogénea en la que el anticuerpo monoclonal está compuesto por aminoácidos (de origen natural y de origen no natural) que están implicados en la unión selectiva de un antígeno. Una población de anticuerpos monoclonales es altamente específica, estando dirigida contra un solo sitio antigénico. La expresión “anticuerpo monoclonal” incluye no solo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), cadena sencilla (ScFv), mutantes de los

5 mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad necesaria y la capacidad para unirse a un antígeno. No pretende limitarse con respecto a la fuente del anticuerpo o a la forma en la que se prepara (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fago, expresión recombinante, animales transgénicos, etc.).

Un anticuerpo de cadena sencilla (scFc) es un anticuerpo en el que regiones VL y VH se emparejan para formar una molécula monovalente por medio de un engarce sintético que permite que se preparen como una sola cadena proteica (Bird y col Science, 242: 423-426 (1988) y Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883 (1988)).

10 Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que se expresan dominios VH y VL en una sola cadena polipeptídica, pero usando un engarce que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando de este modo a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

15 Los "anticuerpos quiméricos" se refieren a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpo derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase particular, mientras que el segmento restante de las cadenas es homólogo a secuencias correspondientes en otra. Típicamente, en estos anticuerpos quiméricos, la región variable de las cadenas tanto pesada como ligera mimetiza las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamífero, mientras que las porciones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una clara ventaja de dichas formas quiméricas es que, por ejemplo, 20 las regiones variables pueden obtenerse convenientemente de fuentes actualmente conocidas usando hibridomas o células B fácilmente disponibles de organismos huésped no humanos en combinación con regiones constantes obtenidas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Aunque la región variable tiene la ventaja de facilidad de preparación y la especificidad no se ve afectada por su fuente, al ser humana la región constante es menos probable que genere una respuesta inmune de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que la que 25 generaría la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o a la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, en solitario o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones flanqueantes (FR) conectadas por tres regiones 30 determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar CDR: (1) una estrategia basada en la variabilidad de secuencia cruzada entre especies (es decir, Kabat y col. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda MD)); y (2) una estrategia 35 basada en estudios cristalográficos de complejos de antígeno-anticuerpo (Chothia y col. (1989) Nature 342: 877; Al-lazikani y col (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). Como se usa en el presente documento, una CDR puede referirse a CDR definidas mediante cualquier estrategia o mediante una combinación de ambas estrategias.

Una "región constante" de un anticuerpo se refiere a la región constante de la cadena ligera del anticuerpo o a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo, en solitario o en combinación.

40 Como se usan en el presente documento, los términos "E3", "3E" y "anticuerpo E3" se usan indistintamente para referirse a un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera mostradas en las SEC ID N°:1 y SEC ID N°:2 (Figuras 1A y 1B del documento WO2004/058184), respectivamente. La generación y la caracterización de E3 se describe en los Ejemplos del documento WO2004/058184. En algunas realizaciones, el término "E3" se refiere a una inmunoglobulina codificada por (a) 45 un polinucleótido que codifica la cadena ligera de E3 que tiene un número de depósito de la ATCC N° PTA-4893 o ATCC N° PTA-4894 y (b) un polinucleótido que codifica la cadena pesada de E3 que tiene un número de depósito de la ATCC N° PTA-4895.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "anticuerpo aislado" o "anticuerpo purificado" se refieren a 50 un anticuerpo que, en virtud de su origen o fuente de obtención, tiene de una a cuatro de las siguientes: (1) no está asociado con los componentes asociados de forma natural que lo acompañan en su estado nativo, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente o (4) no se produce en la naturaleza.

Un anticuerpo es "sustancialmente puro", "sustancialmente homogéneo" o "sustancialmente purificado" cuando al 55 menos aproximadamente del 60 al 75% de una muestra muestra una sola especie de anticuerpo. Un anticuerpo sustancialmente puro puede comprender típicamente aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80% o 90% p/p de una muestra de anticuerpo, más habitualmente aproximadamente el 95%, y preferentemente tendrá una pureza superior al 99%. La pureza u homogeneidad del anticuerpo pueden ensayarse por varios medios bien conocidos en la técnica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o HPLC.

Como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo humano” pretende incluir anticuerpos que tienen regiones constantes y variables derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Esta definición de anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de cadena pesada humana o al menos un polipéptido de cadena ligera humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden

incluir restos aminoacídicos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica *in vitro*, o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR y, en particular, CDR3. Sin embargo, la expresión “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias de CDR obtenidas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como ratón, se hayan injertado en secuencias flanqueantes humanas.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo “humanizado” se refiere a formas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) que son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos), que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Preferentemente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región flanqueante (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR o secuencias flanqueantes importadas, pero que se incluyen para refinar adicionalmente y optimizar el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de un dominio o región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente de una inmunoglobulina humana. Se prefieren anticuerpos que tienen regiones Fc modificadas como se describen en el documento WO 99/58572. Otras formas de anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 o CDR H3) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR “derivadas de” una o más CDR del anticuerpo original.

Hay cuatro etapas generales para humanizar un anticuerpo monoclonal. Estas son: (1) determinar el nucleótido y la secuencia de aminoácidos esperada de los dominios variables de cadena ligera y pesada del anticuerpo de partida, (2) diseñar el anticuerpo humanizado, es decir, decidir qué región flanqueante de anticuerpo usar durante el procedimiento de humanización, (3) las metodologías/técnicas de humanización reales y (4) la transfección y expresión del anticuerpo humanizado. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.567; 5.807.715; 5.866.692; 6.331.415; 5.530.101; 5.693.761; 5.693.762; 5.585.089; y 6.180.370.

Se han descrito varias moléculas de anticuerpo “humanizadas” que comprenden un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina no humana, incluyendo anticuerpos quiméricos que tienen regiones V de roedor o de roedor modificadas, y sus regiones determinantes de complementariedad asociadas (CDR) fusionadas a dominios constantes humanos.

Véase, por ejemplo, Winter y col. Nature 349: 293-299 (1991), Lobuglio y col. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 4220-4224 (1989), Shaw y col. J Immunol. 138: 4534-4538 (1987), y Brown y col. Cancer Res. 47: 3577-3583 (1987). Otras referencias describen CDR de roedor injertadas en una región flanqueante (FR) de soporte humana antes de la fusión con un dominio constante de anticuerpo humano apropiado. Véase, por ejemplo, Riechmann y col. Nature 332: 323-327 (1988), Verhoeven y col. Science 239: 1534-1536 (1988), y Jones y col. Nature 321: 522-525 (1986). Otra referencia describe CDR de roedor soportadas por regiones flanqueantes de roedor revestidas recombinantemente. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Europea N° 0519596. Estas moléculas “humanizadas” están diseñadas para minimizar la respuesta inmunológica no deseada hacia moléculas de anticuerpo de roedor anti-humano que limita la duración y eficacia de las aplicaciones terapéuticas de esos restos en receptores humanos. Por ejemplo, la región constante de anticuerpo puede modificarse por ingeniería genética de modo que sea inmunológicamente inerte (por ejemplo, que no desencadene la lisis por el complemento). Véase, por ejemplo, la Publicación PCT N° WO99/58572; Solicitud de Patente del Reino Unido N° 9809951.8. Otros procedimientos de humanización de anticuerpos que también pueden utilizarse se describen por Daugherty y col., Nucl. Acids Res. 19: 2471-2476 (1991) y en las Patentes de Estados Unidos N° 6.180.377; 6.054.297; 5.997.867; 5.866.692; 6.210.671; y 6.350.861; y en la Publicación PCT N° WO 01/27160.

Como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo recombinante” pretende incluir todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, por ejemplo, los anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante usado para transfectar una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que sea transgénico para genes de inmunoglobulina humanos o anticuerpos preparados, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro*.

Como se usan en el presente documento, las expresiones “es capaz de unirse específicamente”, “se une específicamente” o “se une preferentemente” se refieren a cuando un anticuerpo se une a un antígeno con una

constante de disociación que es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 1 \text{ nM}$ y, más preferentemente, $\leq 10 \text{ pM}$. Un epítipo que "se une específicamente" o "se une preferentemente" (usadas indistintamente en el presente documento) a un anticuerpo o un polipéptido es una expresión bien entendida en la técnica, y también se conocen bien en la técnica procedimientos para determinar dicha unión específica o preferente. Se dice que una molécula muestra una "unión específica" o "unión preferente" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular de lo que lo hace con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferentemente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferentemente a un epítipo de NGF es un anticuerpo que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otros epítipos de NGF o epítipos que no sean de NGF. También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específicamente o preferentemente a una primera diana puede o no unirse específicamente o preferentemente a una segunda diana. Como tal, una "unión específica" o "unión preferente" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) una unión exclusiva.

Como se usa en el presente documento, una unión "inmuno-específica" de anticuerpos se refiere a la interacción de unión específica de antígeno que se produce entre el sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo y el antígeno específico reconocido por ese anticuerpo (es decir, el anticuerpo reacciona con la proteína en un ELISA u otro inmunoensayo y no reacciona de forma detectable con proteínas no relacionadas). El término "competir", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, significa que un primer anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo de una forma lo bastante similar a la unión de un segundo anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, de modo que el resultado de la unión del primer anticuerpo con su epítipo afín se disminuye de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en la que la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también se disminuye de forma detectable en presencia del primer anticuerpo puede ser, pero no tiene por qué ser el caso. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que el segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su epítipo respectivo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando afín, ya sea en el mismo, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos presentan "competición cruzada" entre sí por la unión de su epítipo o epítipos respectivos. Tanto los anticuerpos de competición como los de competición cruzada se incluyen en la presente divulgación. Independientemente del mecanismo por el que se produzca dicha competición o competición cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio conformacional o unión a un epítipo común o porción del mismo), el experto apreciará, basándose en los contenidos proporcionados en el presente documento, que dichos anticuerpos de competición y/o competición cruzada se incluyen y pueden ser útiles para los procedimientos desvelados en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "factor de crecimiento nervioso" y "NGF" se refieren al factor de crecimiento nervioso y a variantes del mismo que conservan al menos parte de la actividad biológica del NGF. Como se usa en el presente documento, el NGF incluye todas las especies de mamífero de NGF de secuencia nativa, incluyendo ser humano, canino, felino, equino o bovino.

El "receptor de NGF" se refiere a un polipéptido que se une por o se activa por NGF. Los receptores de NGF incluyen el receptor TrkA y el receptor p75 de cualquier especie de mamífero, incluyendo, pero sin limitación, ser humano, canino, felino, equino, primate o bovino.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo anti-NGF" (denominado indistintamente "anticuerpo antagonista anti-NGF") se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse a NGF e inhibir, bloquear, antagonizar, suprimir o reducir la actividad biológica de NGF y/o una ruta o rutas aguas abajo mediadas por la señalización de NGF. En algunas realizaciones, la expresión "anticuerpo antagonista anti-NGF" incluye todos los términos, títulos y estados funcionales identificados anteriormente y características por las que el propio NGF, una actividad biológica de NGF (incluyendo, pero sin limitación, su capacidad para mediar cualquier aspecto del dolor postquirúrgico) o las consecuencias de la actividad biológica, se anulan, disminuyen o neutralizan sustancialmente en cualquier grado significativo. En algunas realizaciones, un anticuerpo antagonista anti-NGF se une a NGF e impide la dimerización de NGF y/o la unión a un receptor de NGF (tal como p75 y/o trkA). En otras realizaciones, un anticuerpo anti-NGF se une a NGF e impide la dimerización del receptor trkA y/o la autofosforilación de trkA. Se proporcionan en el presente documento ejemplos de anticuerpos antagonistas anti-NGF.

El término "identidad" se refiere al porcentaje de "identidad" de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico. El porcentaje de identidad se determina generalmente por alineamiento de las secuencias con el fin de una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la primera secuencia para un mejor alineamiento con la segunda secuencia) y comparación de los restos aminoácidos o nucleótidos en las posiciones correspondientes. El "mejor alineamiento" es un alineamiento de dos secuencias que da como resultado el mayor porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad se determina por comparación del número de restos aminoácidos o nucleótidos idénticos dentro de las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100).

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático conocido por los expertos en la materia. Un ejemplo de un algoritmo matemático para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y

Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, y col (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 han incorporado dicho algoritmo. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos en BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la invención. Pueden realizarse búsquedas de proteínas en BLAST con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula proteica de la invención. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, puede utilizarse BLAST con huecos como se describe en Altschul y col. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Como alternativa, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterativa que detecte relaciones distantes entre moléculas (Ídem). Cuando se utilizan los programas BLAST, BLAST con Huecos y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Otro ejemplo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). El programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG ha incorporado dicho algoritmo. Otros algoritmos para análisis de secuencia conocidos en la técnica incluyen ADVANCE y ADAM, como se describe en Torellis y Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci., 10: 3-5; y FASTA, descrito en Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 2444-8. Dentro de FASTA, la ktup es una opción de control que ajusta la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado terapéutico deseado, que en el contexto de anticuerpos anti-NGF incluye el tratamiento o la prevención profiláctica de la afección patológica diana, por ejemplo, la inflamación o el dolor. Debe señalarse que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deberían ajustarse con el tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el juicio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son solamente ejemplares y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada. Así mismo, una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o porción de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo para generar una respuesta deseada en el individuo y la vía de administración deseada de la formulación de anticuerpo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o porción de anticuerpo pese menos que los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas preventivas o profilácticas, en el que el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir la gravedad) de la afección patológica diana, por ejemplo el dolor. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya presentan la afección, así como los propensos a presentar la afección o aquellos en los que debe prevenirse la afección. Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" es una estrategia para obtener resultados clínicos deseados o beneficiosos incluyendo, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: incluyendo disminución de la gravedad, alivio de uno o más síntomas asociados con el dolor, incluyendo cualquier aspecto del dolor (tal como acortamiento de la duración del dolor, reducción de la sensibilidad al dolor o de la sensación de dolor).

Una "cantidad eficaz" de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos tales como alivio o reducción de la afección patológica diana, por ejemplo, sensación de dolor. Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Para los fines de la presente invención, una cantidad eficaz de fármaco, compuesto o composición farmacéutica es una cantidad suficiente para tratar, mejorar, reducir la intensidad de la afección patológica diana, por ejemplo, la inflamación o el dolor. En algunas realizaciones, la "cantidad eficaz" puede reducir el dolor en posición de descanso (dolor en reposo) o dolor inducido mecánicamente (incluyendo dolor después del movimiento), o ambos, y puede administrarse antes, durante o después del estímulo doloroso. Como se entiende en el contexto clínico, una cantidad eficaz de un fármaco, compuesto o composición farmacéutica puede o no alcanzarse junto con otro fármaco, compuesto o composición farmacéutica. Por lo tanto, una "cantidad eficaz" puede considerarse en el contexto de la administración de uno o más agentes terapéuticos, y puede considerarse que un solo agente se administra en una cantidad eficaz si, junto con uno o más agentes distintos, puede conseguirse o se consigue un resultado deseable.

El "dolor", como se usa en el presente documento, se refiere a dolor de cualquier etiología, incluyendo dolor agudo y crónico, y cualquier dolor con un componente inflamatorio. Como se usa en el presente documento, el término "dolor" incluye nocicepción y sensación de dolor, y el dolor puede evaluarse objetivamente y subjetivamente, usando puntuaciones del dolor y otros procedimientos bien conocidos en la técnica. El dolor puede ser dolor primario o secundario, como se sabe bien en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" para los fines del tratamiento incluye cualquier sujeto y preferentemente es un sujeto que requiere el tratamiento de la afección patológica diana, por ejemplo, la inflamación o el dolor. Para los fines de la prevención, el sujeto es cualquier sujeto y, preferentemente, es un sujeto en riesgo de o predispuesto a desarrollar la afección patológica diana, por ejemplo, la inflamación o el dolor. El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos, por ejemplo, procariotas y eucariotas. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales transgénicos no humanos. En realizaciones específicas de la invención, el sujeto es un ser

humano.

Cuando se introducen elementos de la presente invención o de la realización o realizaciones preferidas de la misma, los artículos “un”, “uno/a”, “el/la” y “dicho/a” pretenden significar que hay uno o más elementos. Los términos “que comprende” “comprender”, “comprende”, “que incluye” y “que tiene” pretenden ser incluyentes y significar que puede haber elementos adicionales distintos de los elementos enumerados.

Como se usa en el presente documento, el término “polinucleótido” o “ácido nucleico”, usados indistintamente en el presente documento, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos, o a una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, y pueden ser formas monocatenarias y bicatenarias. Una secuencia “polinucleotídica” o “de ácido nucleico” incluye su complementaria a menos que se especifique otra cosa. Como se usa en el presente documento, la expresión “polinucleótido aislado” o “ácido nucleico aislado” se refiere a un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o a alguna combinación de los mismos que, en virtud de su origen o fuente de procedencia, el polinucleótido aislado tiene de uno a tres de los siguientes: (1) no está asociado con todo o una porción de un polinucleótido con el que el “polinucleótido aislado” se encuentra en la naturaleza, (2) está unido operativamente a un polinucleótido con el que no está unido en la naturaleza o (3) no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia de mayor tamaño.

Como se usa en el presente documento, la expresión “agente quelante” es un excipiente que puede formar al menos un enlace (por ejemplo, covalente, iónico o de otro tipo) con un ión metálico. Un agente quelante es típicamente un ligando multidentado que puede usarse en composiciones líquidas como estabilizante para formar complejos con especies que, de otro modo, podrían promover la inestabilidad.

Como se usa en el presente documento, el término “tampón” se refiere a una composición añadida que permite que una formulación líquida de anticuerpo resista cambios en el pH, típicamente por acción de sus componentes conjugados con ácidos-bases. Cuando se hace referencia a una concentración de tampón, se pretende que la concentración indicada represente la concentración molar de la forma de base libre o ácido libre del tampón.

Como se usan en el presente documento, las expresiones “agente de tonicidad” o “tonificante” se refieren a un excipiente que puede ajustar la presión osmótica de una formulación líquida de anticuerpo. En ciertas realizaciones, el agente de tonicidad puede ajustar la presión osmótica de una formulación líquida de anticuerpo a isotónica, de modo que la formulación de anticuerpo sea fisiológicamente compatible con las células del tejido corporal del sujeto. En otras realizaciones más, el “agente de tonicidad” puede contribuir a una mejora en la estabilidad de los anticuerpos descritos en el presente documento. Una formulación “isotónica” es una que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Generalmente las formulaciones isotónicas tienen una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término “hipotónico” describe una formulación con una presión osmótica por debajo de la de la sangre humana. De forma correspondiente, el término “hipertónico” se usa para describir una formulación con una presión osmótica por encima de la de la sangre humana. La isotonicidad puede medirse usando un osmómetro del tipo de presión de vapor o de punto de congelación, por ejemplo. El agente de tonicidad puede estar en forma enantiomérica (por ejemplo, enantiómero L o D) o forma racémica; isómeros tales como alfa o beta, incluyendo alfa, alfa; o beta, beta; o alfa, beta; o beta, alfa; una forma de base libre o ácido libre; una forma hidratada (por ejemplo, monohidrato) o una forma anhidra.

Como se usa en el presente documento, el término “poliol” se refiere a un excipiente con múltiples grupos hidroxilo, e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes de azúcares y ácidos de azúcares.

Como se usa en el presente documento, el término “tensioactivo” se refiere a un excipiente que puede alterar la tensión superficial de una formulación líquida de anticuerpo. En ciertas realizaciones, el tensioactivo reduce la tensión superficial de una formulación líquida de anticuerpo. En otras realizaciones más, el “tensioactivo” puede contribuir a una mejora en la estabilidad de cualquier anticuerpo en la formulación. El tensioactivo puede reducir la agregación del anticuerpo formulado y/o minimizar la formación de particulados en la formulación y/o reduce la adsorción. El tensioactivo también puede mejorar la estabilidad del anticuerpo durante y después de un ciclo de congelación/descongelación.

Como se usa en el presente documento, el término “sacárido” se refiere a una clase de moléculas que son derivados de alcoholes polihídricos. Los sacáridos se denominan comúnmente carbohidratos y pueden contener diferentes cantidades de unidades de azúcar (sacárido), por ejemplo, monosacáridos, disacáridos y polisacáridos.

Como se usa en el presente documento, la expresión “azúcar reductor” se refiere a uno que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir los iones metálicos o reaccionar covalentemente con lisina y otros grupos amino en proteínas, y un “azúcar no reductor” es uno que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor.

Como se usa en el presente documento, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquier material que, cuando se combina con un principio activo, permite que el principio conserve su actividad biológica y no reaccione con el sistema inmune del sujeto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua, y diversos tipos de agentes humectantes. Los diluyentes preferidos para su administración parenteral o en aerosol son solución salina tamponada con fosfato o solución salina normal (0,9%).

Las composiciones que comprenden dichos vehículos se formulan por procedimientos convencionales bien conocidos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; y Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20ª Ed. Mack Publishing, 2000).

- 5 El término " K_{off} ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo de antígeno/anticuerpo.

El término " K_d ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción de antígeno-anticuerpo. Un modo para determinar la K_d o la afinidad de unión de anticuerpos a NGF es midiendo la afinidad de unión de fragmentos Fab monofuncionales del anticuerpo. Para obtener fragmentos Fab monofuncionales, un anticuerpo (por ejemplo, IgG) puede escindirse con papaína o expresarse de forma recombinante. La afinidad de un fragmento Fab anti-NGF de un anticuerpo puede determinarse por resonancia de plasmón superficial (sistema de resonancia de plasmón superficial (RPS) BIAcore3000™, BIAcore, INC, Piscaway NJ). Pueden activarse microplacas CM5 con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Puede diluirse NGF humano (o cualquier otro NGF) en acetato sódico 10 mM pH 4,0 e inyectarse sobre la microplaca activada a una concentración de 0,005 mg/ml. Usando un tiempo de flujo variable a través de los canales individuales de la microplaca, pueden conseguirse dos intervalos de densidad de antígeno: 100-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados y 500-600 UR para ensayos de exploración. Se inyectan diluciones seriadas (0,1-10x K_D estimada) de muestras de Fab purificados durante 1 min a 100 microlitros/min y se permiten tiempos de disociación de hasta 2 h. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan por ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE usando un Fab de concentración conocida (según se determinó por análisis de aminoácidos) como patrón. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) cinéticas se obtienen simultáneamente por ajuste de los datos a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de disociación en equilibrio (K_D) se calcular como K_{off}/k_{on} . Este protocolo es adecuado para su uso en la determinación de la afinidad de unión de un anticuerpo a cualquier NGF, incluyendo NGF humano, NGF de otro vertebrado (en algunas realizaciones de mamífero) (tal como NGF de ratón, NGF de rata, NGF de primate), así como para su uso con otras neurotrofinas, tales como las neurotrofinas relacionadas NT3, NT4/5 y/o BDNF.

Los anticuerpos antagonistas anti-NGF para su uso en la invención pueden identificarse o caracterizarse usando procedimientos conocidos en la técnica, por los que se detecta y/o mide la reducción, mejoría o neutralización de una actividad biológica de NGF. Pueden usarse los procedimientos descritos en el documento PCT WO 04/065560. Otro procedimiento, por ejemplo, un ensayo de activación de receptor de quinasa (KIRA), descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.766.863 y 5.891.650, puede usarse para identificar agentes anti-NGF.

También pueden identificarse anticuerpos antagonistas anti-NGF por incubación de un agente candidato, por ejemplo, un anticuerpo, o anticuerpo anti-NGF, con NGF, y control de una o más de cualquiera de las siguientes características: (a) unión a NGF e inhibición de la actividad biológica de NGF o de rutas aguas abajo mediadas por la función de señalización de NGF; (b) inhibición, bloqueo o disminución de la activación del receptor de NGF (incluyendo dimerización y/o autofosforilación de TrkA); (c) aumento del aclaramiento de NGF; (d) tratamiento o prevención del dolor; (e) inhibición (reducción) de la síntesis, producción o liberación de NGF. La capacidad de un anticuerpo antagonista anti-NGF para bloquear o neutralizar una actividad biológica de NGF también puede evaluarse por control de la capacidad del agente candidato para inhibir la supervivencia mediada por NGF en el bioensayo de supervivencia de ganglios de las raíces dorsales de rata embrionaria, como se describe en Hongo y col., Hybridoma 19: 215-227 (2000).

La "reducción de la incidencia" de dolor se refiere a cualquiera de reducir la gravedad (que puede incluir reducir la necesidad y/o la cantidad de (por ejemplo, exposición a) otros fármacos y/o terapias usados generalmente para estas afecciones, incluyendo, por ejemplo, opiáceos), duración y/o frecuencia (incluyendo, por ejemplo, retrasar o aumentar el tiempo hasta el dolor postquirúrgico en un individuo). Como entienden los expertos en la materia, los individuos pueden variar en términos de su respuesta al tratamiento y, como tal, por ejemplo, un "procedimiento de reducción de la incidencia de dolor por artritis reumatoide o dolor por artrosis en un individuo" refleja administrar el anticuerpo antagonista anti-NGF basándose en una esperanza razonable de que dicha administración pueda causar probablemente una reducción en la incidencia en ese individuo particular.

La "mejoría" de un dolor o de uno o más síntomas de un dolor (tal como dolor por artritis reumatoide o dolor por artrosis) se refiere a disminuir la gravedad o mejorar uno o más síntomas de un dolor en comparación con la no administración de un anticuerpo antagonista anti-NGF. La "mejoría" también incluye el acortamiento o la reducción de la duración de un síntoma.

La "paliación" de un dolor o uno o más síntomas de un dolor (tal como dolor por artritis reumatoide o dolor por artrosis) se refiere a disminuir el grado de una o más manifestaciones clínicas no deseables de dolor postquirúrgico en un individuo o población de individuos tratados con un anticuerpo antagonista anti-NGF de acuerdo con la invención.

- Como se usa en el presente documento, el término “retrasar” el desarrollo de dolor se refiere a aplazar, obstaculizar, ralentizar, retardar, estabilizar y/o posponer la progresión del dolor (tal como dolor postquirúrgico, dolor por artritis reumatoide o dolor por artrosis). Este retraso puede ser de longitudes de tiempo variables, dependiendo de la historia de la enfermedad y/o de los individuos a tratar. Como es evidente para un experto en la materia, un retraso suficiente o significativo puede, de hecho, incluir la prevención, en el sentido de que el individuo no desarrolle dolor. Un procedimiento que “retrasa” el desarrollo del síntoma es un procedimiento que reduce la probabilidad de desarrollar el síntoma en una franja de tiempo dado y/o reduce el grado de los síntomas en una franja de tiempo dado, en comparación con no usar el procedimiento. Dichas comparaciones se basan típicamente en estudios clínicos, usando un número estadísticamente significativo de sujetos.
- El “dolor” se entiende que se refiere a una experiencia sensitiva y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial o descrita en los términos de dicho daño. El dolor puede dividirse en varias áreas diferentes debido a una fisiopatología diferente, incluyendo estas dolor nociceptivo, inflamatorio, neuropático, etc. Debería señalarse que algunos tipos de dolor tienen múltiples etiologías y, por lo tanto, pueden clasificarse en más de una área, por ejemplo, el dolor de espalda y el dolor por cáncer tienen componentes tanto nociceptivos y neuropáticos.
- El “dolor crónico”, como se usa en el presente documento, se entiende que significa dolor asociado con un trastorno crónico, es decir, traumatismo, tumor maligno, enfermedad, infección o dolor que persiste más allá de la resolución de dicho trastorno subyacente, o de la cicatrización de una lesión, y que con frecuencia es más intenso de lo que el proceso o trastorno subyacente pronosticaría. El dolor crónico también puede ser un “dolor de etiología mixta”, que implique por ejemplo tanto dolor neuropático como nociceptivo y/o dolor inflamatorio y/o dolor por cáncer. Como consecuencia, el dolor crónico es con frecuencia impredecible en su respuesta a la analgesia. El “dolor de mecanismo doble” se entiende que se refiere al dolor que se amplifica y mantiene tanto por sensibilización central como periférica.
- El “dolor inflamatorio” se entiende que se refiere al dolor en respuesta a una lesión tisular y al proceso inflamatorio resultante. El dolor inflamatorio puede originarse en un tejido lesionado que experimenta un proceso inflamatorio reactivo que también puede afectar a la función neuronal. El dolor inflamatorio puede implicar la unión de mediadores bioquímicos (PGE_2 , bradiquinina, citocinas y neuropéptidos) a receptores en neuronas transmisoras de dolor y la alteración de su función, aumentando su excitabilidad y aumentando de este modo la sensación dolorosa. En el término de dolor inflamatorio se incluye el dolor crónico y agudo.
- El “dolor de etiología mixta” se entiende que se refiere al dolor que contiene componentes inflamatorios y/o neuropáticos y/o nociceptivos. El “dolor de mecanismo doble” se entiende que se refiere al dolor que se amplifica y mantiene tanto por sensibilización periférica como central.
- El “dolor neuropático” se entiende que se refiere al dolor producido por daños en o disfunción de neuronas en el sistema nervioso central o periférico.
- El “dolor agudo” y el “dolor inflamatorio agudo” se entiende que se refieren a la respuesta fisiológica normal, predecible y apropiada a un estímulo químico, térmico o mecánico nocivo o a un proceso patológico que amenaza o produce una lesión tisular que conduce a la respuesta de inflamación aguda y dolor inflamatorio agudo, dicho dolor agudo implica con frecuencia un componente de dolor nociceptivo. En general, la intensidad del dolor agudo es proporcional a la intensidad del estímulo y persiste siempre que persista el estímulo o hasta que cicatrice la lesión tisular. El dolor inflamatorio agudo está asociado generalmente con una lesión, procedimientos invasivos, traumatismo, infección, reacción inmune, alergia, hipersensibilidad y enfermedad.
- El “dolor nociceptivo” se entiende que significa un dolor que se transmite por nociceptores, causado por estímulos nocivos que señalan una lesión tisular o una lesión tisular inminente. El dolor nociceptivo implica la transmisión de señales de dolor por neuronas aferentes hasta el asa dorsal de la médula espinal, las neuronas de segundo orden transmiten las señales a los centros superiores.
- El dolor nociceptivo se resuelve normalmente una vez que se resuelve la afección que lo ha precipitado, característica también del dolor agudo.
- La “hiperalgesia” es una sensibilidad extrema al dolor, causada con frecuencia por daños en nociceptores en los tejidos blandos del cuerpo. Puede experimentarse de forma focal, que se asocia típicamente con una lesión, y se divide en dos subtipos: (1) hiperalgesia primaria, es decir, sensibilidad dolorosa que se produce directamente en los tejidos dañados; (2) hiperalgesia secundaria, es decir, sensibilidad dolorosa que se produce en tejidos no dañados circundantes. También puede experimentarse como una forma más difusa, de amplitud corporal. La hiperalgesia puede inducirse por una afección inflamatoria aguda o crónica. Es clave para el desarrollo de dicha hiperalgesia la acción del factor agregante plaquetario (PAF) resultante de dicha afección inflamatoria o de una respuesta alérgica, y que se produce por células inmunes que interactúan con el sistema nervioso periférico y liberan citocinas y quimiocinas que conducen a dolor. Las afecciones inflamatorias pueden inducir la estimulación de fibras dolorosas en un patrón que concuerda con una forma de amplificación en la médula espinal denominada potenciación a largo plazo, y dicha amplificación en la médula espinal proporciona una vía que produce hiperalgesia.

La “alodinia” es el dolor resultante de estímulos que normalmente no son dolorosos, una respuesta exagerada a

estímulos de otro modo no nocivos y que puede ser una alodinia estática o dinámica, es decir, aparecer espontáneamente sin movimiento o con movimiento. La alodinia también puede percibirse en otras áreas distintas a la estimulada; por lo tanto, también puede ser disestésica. Es común a las afecciones inflamatorias, particularmente la inflamación articular.

- 5 El "dolor somático" se entiende que se refiere al dolor que se origina en los tejidos profundos o cutáneos, cuando se produce en los tejidos musculoesqueléticos se denomina "dolor somático profundo". El "dolor visceral" se entiende que se refiere al dolor causado por la activación de receptores de dolor resultante de la infiltración, compresión, extensión o estrechamiento de las vísceras torácicas, abdominales o pélvicas.

- 10 El término "dolor", como se usa en el presente documento, se refiere a dolor de cualquier etología, incluyendo dolor agudo y crónico y cualquier dolor con un componente inflamatorio. Los ejemplos de dolor incluyen dolor postquirúrgico, dolor postoperatorio (incluyendo dolor dental), migraña, cefalea y neuralgia trigeminal, dolor asociado con quemaduras, heridas o cálculos renales, dolor asociado con traumatismo (incluyendo lesión traumática craneal), dolor neuropático, dolor de espalda tal como el dolor crónico de la parte inferior de la espalda, dolor asociado con trastornos musculoesqueléticos tales como artritis reumatoide, dolor asociado con artrosis, espondilitis anquilosante, artropatías seronegativas (no reumatoides), trastornos periarticulares y de reumatismo no articular y dolor asociado con cáncer (incluyendo "dolor intercurrente", y dolor asociado con cáncer terminal y dolor debido a metástasis óseas), neuropatía periférica y neuralgia postherpética, dolor asociado con cistitis intersticial y/o síndrome de vejiga dolorosa y/o síndrome de dolor de vejiga, dolor asociado con prostatitis crónica y/o síndrome de dolor pélvico crónico, dolor asociado con endometriosis y/o fibroides uterinos. Los ejemplos de dolor con un componente inflamatorio (además de algunos de los descritos anteriormente) incluyen dolor reumático, dolor asociado con mucositis y dismenorrea.
- 15
- 20

- 25 El "dolor postquirúrgico" (denominado indistintamente "postincisional" o "dolor posttraumático") se refiere al dolor que surge o se obtiene como resultado de un traumatismo externo tal como un corte, punción, incisión, rotura o herida en un tejido de un individuo (incluyendo el que surge de todos los procedimientos quirúrgicos, ya sean invasivos o no invasivos). Como se usa en el presente documento, el dolor postquirúrgico no incluye el dolor que aparece (surge o se origina) sin un traumatismo físico externo. En algunas realizaciones, el dolor postquirúrgico es un dolor interno o externo (incluyendo periférico) y la herida, corte, traumatismo, rotura o incisión puede suceder accidentalmente (como con una herida traumática) o de forma deliberada (como con una incisión quirúrgica). Como se usa en el presente documento, el "dolor" incluye la nocicepción y la sensación de dolor, y el dolor puede evaluarse objetivamente y subjetivamente usando puntuaciones de dolor y otros procedimientos bien conocidos en la técnica. El dolor postquirúrgico, como se usa en el presente documento, incluye alodinia (es decir, una respuesta aumentada a un estímulo normalmente no nocivo) e hiperalgesia (es decir, una respuesta aumentada a un estímulo normalmente nocivo o desagradable) que, a su vez, puede ser de naturaleza térmica o mecánica (táctil). En algunas realizaciones, el dolor se caracteriza por sensibilidad térmica, sensibilidad mecánica y/o dolor en reposo. En algunas realizaciones, el dolor postquirúrgico comprende dolor inducido mecánicamente o dolor en reposo. En otras realizaciones, el dolor postquirúrgico comprende dolor en reposo.
- 30
- 35

El dolor puede ser un dolor primario o secundario, como se sabe bien en la técnica.

- 40 El dolor asociado con cistitis intersticial y/o síndrome de vejiga dolorosa y/o síndrome de dolor de vejiga puede comprender dolor abdominal inferior (pélvico); dolor de vejiga; dolor suprapúbico; dolor vaginal; dolor en el pene, testículos, escroto y perineo; dolor uretral; dispareunia; dolor, presión o malestar que puede aumentar a medida que se llena la vejiga.

- 45 El dolor asociado con prostatitis crónica y/o síndrome de dolor pélvico crónico puede comprender dolor abdominal inferior (pélvico); dolor en hipogastrio; dolor de vejiga; dolor suprapúbico; dolor vaginal; dolor en el pene, testículos, escroto y perineo; dolor uretral; dispareunia; dolor, presión o malestar que puede aumentar a medida que se llena la vejiga; disuria; y dolor eyaculatorio.

- 50 Los síntomas del tracto urinario inferior (TUI) pueden comprender tres grupos de síntomas urinarios, que pueden definirse como síntomas del almacenamiento (irritantes), del vaciamiento (obstructivos) y postmicción. Los síntomas del almacenamiento comprenden urgencia, frecuencia, nocturia, incontinencia de urgencia e incontinencia por estrés, que pueden estar asociados con vejiga sobreactiva (OAB) e hiperplasia prostática benigna (HPB). Los síntomas del vaciamiento comprenden vacilación, escaso flujo, intermitencia, esfuerzos y disuria. Los síntomas postmicción comprenden goteo terminal, goteo postvaciamiento y una sensación de vaciamiento incompleto.

- 55 El dolor y/u otros síntomas asociados con endometriosis y/o fibroides uterinos pueden comprender dismenorrea; dolor pélvico crónico no menstrual; dispareunia; disquécia; menorragia; dolor abdominal inferior o de espalda; infertilidad y subfertilidad; disuria; hinchazón y dolor en la micción; náuseas, vómitos y/o diarrea. Los síntomas también pueden comprender síntomas relacionados con lesiones endometriósicas o fibroides localizados fuera de la cavidad peritoneal incluyendo, por ejemplo, síndrome de endometriosis torácica manifestado como hemoptisis, neumotórax o hemotórax, y leiomiomas pulmonar manifestada como disnea y masa pulmonar.

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar la invención. Se hace referencia a los Ejemplos del documento

WO2004/058184 para ilustrar los anticuerpos para su uso en la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 Producción y purificación de anticuerpo

Para la expresión de anticuerpos completos, se clonaron las regiones variables de cadena ligera y pesada en dos vectores de expresión de mamífero (Eb.911.E3 o Eb.pur.911.3E para la cadena ligera y Db.911.3E para la cadena pesada; descritos en el presente documento) y se usaron para transfectar, usando lipofectamina, células HEK 293 para su expresión transitoria. Los anticuerpos se purificaron usando proteína A usando procedimientos convencionales.

La generación, producción, purificación y caracterización del anticuerpo anti-NGF E3 se describe en los Ejemplos del documento WO2004/0581. Se han depositado vectores que incorporan la cadena ligera de E3 y la cadena pesada de E3 en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia, Estados Unidos (ATCC):

<i>Material</i>	<i>Nº de Acceso ATCC</i>	<i>Fecha de Depósito</i>
Eb.911.3E cadena ligera de E3	PTA-4893	8 de enero de 2003
Eb.pur.911.3E cadena ligera de E3	PTA-4894	8 de enero de 2003
Db.911.3E cadena pesada de E3	PTA-4895	8 de enero de 2003

Pueden encontrarse detalles en relación con estos depósitos en el documento WO2004058184.

Se diseñaron y construyeron tres vectores de expresión de mamífero para su uso en la expresión de anticuerpo E3 en células de mamífero.

El vector Db.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de la cadena pesada del anticuerpo E3 y la región constante de IgG2a humana, y es adecuado para la expresión transitoria o estable de la cadena pesada. El Db.911.3E consiste en las secuencias de nucleótidos correspondientes a las regiones siguientes: la región promotora de citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); un intrón sintético (nucleótidos 619-1507); la región codificante de DHFR (nucleótidos 707-1267); el péptido señal de la hormona de crecimiento humana (nucleótidos 1525-1602); la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 3E (nucleótidos 1603-1965); la región constante de IgG2a de cadena pesada humana que contiene las mutaciones siguientes: A330P331 a S330S331 (numeración de aminoácidos respecto a la secuencia de IgG2a de tipo silvestre; véase Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624); señal de poliadenilación tardía de SV40 (nucleótidos 2974-3217); región potenciadora de SV40 (nucleótidos 3218-3463); región de fago f1 (nucleótidos 3551-4006) y región codificante de beta lactamasa (AmpR) (nucleótidos 4443-5300). El Db.911.3E se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003 y se le asignó el Nº de Acceso de la ATCC PTA-4895.

El vector Eb.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 y la región constante de la cadena kappa humana, y es adecuado para la expresión transitoria de la cadena ligera. El Eb.911.3E consiste en las secuencias de nucleótidos correspondientes a las regiones siguientes: la región promotora de citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); intrón EF-1 humano (nucleótidos 619-1142); péptido señal de la hormona de crecimiento humana (nucleótidos 1173-1150); región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 (nucleótidos 1251-1571); región constante de la cadena kappa humana (nucleótidos 1572-1892); señal de poliadenilación tardía de SV40 (nucleótidos 1910-2153); región potenciadora de SV40 (nucleótidos 2154-2399); región de fago f1 (nucleótidos 2487-2942) y región codificante de beta lactamasa (AmpR) (nucleótidos 3379-4236). El Eb.911.3E se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003 y se le asignó el Nº de Acceso de la ATCC PTA-4893.

El vector Eb.pur.911.3E es un vector de expresión que comprende la región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 y la región constante kappa humana y es adecuado para la expresión estable de la cadena ligera. Eb.pur.911.3E consiste en las secuencias de nucleótidos correspondientes a las regiones siguientes: la región promotora de citomegalovirus murino (nucleótidos 1-612); intrón EF-1 humano (nucleótidos 619-1758); región codificante del gen pac (puromicina R) (nucleótidos 739-1235); región 5'UTR de hsp70 humano (nucleótidos 1771-1973); péptido señal de la hormona de crecimiento humana (nucleótidos 1985-2062); región variable de la cadena ligera del anticuerpo E3 (nucleótidos 2063-2383); región constante de la cadena kappa humana (nucleótidos 2384-2704); señal de poliadenilación tardía de SV40 (nucleótidos 2722-2965); región potenciadora de SV40 (nucleótidos 2966-3211); región de fago f1 (nucleótidos 3299-3654) y región codificante de beta lactamasa (AmpR) (nucleótidos 4191-5048). El Eb.pur.911.E3 se depositó en la ATCC el 8 de enero de 2003 y se le asignó el Nº de Acceso de la ATCC PTA-4894.

La expresión celular transitoria se realizó de la forma siguiente: células CHO y HEK293T en placas de 150 mm se cotransfectaron de forma transitoria con 25 ug de cada plásmido (es decir, un plásmido que contiene la cadena pesada y un plásmido que contiene la cadena ligera). El ADN se mezcló con 100 ul de lipofectamina 2000

(Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se dejó que los complejos de ADN-lípido contactasen con las células en medio DMEM/F12 sin suero o antibióticos durante 5 horas. Después de esta incubación, los medios se cambiaron para la expresión a Opti-MEM (Invitrogen) sin ningún aditivo durante dos días. Los sobrenadantes celulares que contenían anticuerpo se recogieron secuencialmente hasta cuatro veces con sustitución de medios posterior. Los sobrenadantes se purificaron por cromatografía de afinidad usando resina de Proteína A MapSelect (Amersham biosciences 17-5199-02). El anticuerpo se unió a la resina de proteína A en glicina 0,3 M, tampón de NaCl 0,6 M a pH 8, después se eluyó con tampón citrato 0,1 M a pH 3. Las fracciones que contenían anticuerpos se neutralizaron inmediatamente con tampón Tris 1 M a pH 8,0. Después, las fracciones de anticuerpo se dializaron y se concentraron en PBS. Los anticuerpos se seleccionaron y se ensayaron de la forma siguiente:

Ensayo de Biacore

Se determinaron las afinidades de anticuerpos monoclonales y Fab anti-NGF usando el sistema de resonancia de plasmón superficial (RPS) Biacore3000™ (Biacore, INC, Piscaway NJ). Se activaron microplacas CM5 con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se diluyó NGF humano en acetato sódico 10 mM pH 4,0 y se inyectó sobre la microplaca activada a una concentración de 0,005 mg/ml. Usando un tiempo de flujo variable a través de los canales individuales de la microplaca, se consiguieron dos intervalos de densidad de antígeno: 100-200 unidades de respuesta (UR) para estudios cinéticos detallados y 500-600 UR para ensayos de exploración. La microplaca se bloqueó con etanolamina. Los estudios de regeneración mostraron que una mezcla de tampón de elución Pierce (Producto Nº 21004, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) y NaCl 4 M (2:1) eliminaba eficazmente el Fab unido al tiempo que mantenía la actividad del hNGF en la microplaca durante más de 200 inyecciones. Se usó tampón HBS-EP (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15, EDTA 3 mM, Tensioactivo P29 al 0,005%) como tampón de procesamiento para todos los ensayos de Biacore.

Ensayo de Exploración

Se optimizó un ensayo de exploración de Biacore para determinar la afinidad de clones de Fab de bibliotecas. Se inyectaron los sobrenadantes de lisados de cultivos pequeños a 50 µl/min durante 2 min. Se usaron tiempos de disociación de 10 a 15 minutos para la determinación de una sola velocidad de disociación exponencial (k_{off}) usando el software BIAevaluation. Las muestras que mostraban velocidades de k_{off} en el mismo intervalo que el molde usado para crear la biblioteca (clon 8L2-6D5, k_{off} $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) se inyectaron para su confirmación y se permitieron tiempos de disociación de hasta 45 min para obtener mejores valores de k_{off} . Los clones que mostraban valores de k_{off} mejorados (más lentos) se expresaron a gran escala y los parámetros cinéticos completos, la k_{on} y la k_{off} , se determinaron sobre proteína purificada. El ensayo era capaz de detectar diferencias en la afinidad que eran de aproximadamente 2 veces o mayores.

Ensayo de determinación de la afinidad

Se inyectaron diluciones seriadas (0,1-10x K_D estimada) de muestras de Fab purificados durante 1 min a 100 microlitros/min y se permitieron tiempos de disociación de hasta 2 h. Las concentraciones de las proteínas Fab se determinan por ELISA y/o electroforesis SDS-PAGE usando como patrón un Fab de concentración conocida (según se determinó por análisis de aminoácidos). Se obtuvieron las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) cinéticas simultáneamente por ajuste de los datos a un modelo de unión de Langmuir 1:1 (Karlsson, R. Roos, H. Fagerstam, L. Petersson, B. (1994). Methods Enzymology 6. 99-110) usando el programa BIAevaluation. Los valores de la constante de disociación en equilibrio (K_D) se calcularon como k_{off}/k_{on} .

Ejemplo 2 Análisis de Tampones y pH

Se realizó un estudio para evaluar el efecto de cuatro tampones diferentes sobre la agregación y fragmentación de anticuerpos.

En concreto, se prepararon cuatro formulaciones líquidas que comprendían anticuerpo anti-NGF E3 y tamponadas con acetato, succinato, histidina o citrato. Después, las formulaciones se almacenaron a 5, 25 y 40°C y se tomaron mediciones de la agregación, fragmentación y oxidación de anticuerpo a las 0, 4, 9 y 13 semanas.

El procedimiento de fabricación puede resumirse de la forma siguiente: se prepara el tampón, se ajusta al pH y se esteriliza por filtración (véase las Tablas 2.1 y 2.2 para detalles). El anticuerpo se concentra y después se cambia el tampón. El anticuerpo se analiza con UV y después se diluye con el tampón respectivo a 20 mg/ml. Después, la solución de 20 mg/ml se esteriliza por filtración. Finalmente, la solución estéril se rellena, se tapona y se cubre con un sello de aluminio.

Análisis de Agregación:

Las formulaciones de anticuerpo de la Tabla 2.2 se almacenaron a una temperatura de 5, 25 y 40°C durante 0, 4, 9 y 13 semanas.

Cada formulación se analizó para determinar la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño (CET). La cromatografía de exclusión por tamaño se llevó a cabo usando una columna de gel TSK G3000SWXL-G2000SWXL, fase móvil tampón fosfato sódico 0,2 M a pH 7,0, un caudal de 1 ml/min y detección UV a 214 nm.

- 5 Se calcularon los niveles de agregación por integración de las áreas bajo los picos del cromatograma para cada formulación y descripción de las áreas integradas bajo los picos de especies de alto peso molecular como porcentaje del área total de picos. Como puede observarse en la Tabla 2.3, las formulaciones tamponadas con histidina, particularmente a pH 6, mostraban los menores niveles de agregación, seguidas del acetato, succinato, y después formulaciones tamponadas con citrato, en ese orden.

Análisis de Fragmentación:

- 10 Las formulaciones de anticuerpo de la Tabla 2.2 se almacenaron a una temperatura de 5, 25 y 40°C durante 0, 4, 9 y 13 semanas.

- 15 Cada formulación se analizó también para determinar la fragmentación usando electroforesis capilar en gel reducido (ECGr). Las proteínas se despliegan (desnaturalizan) y se convierten en estructuras “tipo bacilo” después de la escisión de sus enlaces disulfuro en ECG-red. La proteína “reducida” se separa en sus cadenas pesada y ligera permitiendo su cuantificación junto con especies fragmentadas. La ECG reducido se considera un procedimiento fiable para cuantificar el porcentaje de fragmentos (% impurezas). El porcentaje de fragmentación se midió a los tiempos pertinentes para cada una de las formulaciones. Los niveles de fragmentación se calcularon como porcentaje del volumen total de bandas. Como puede observarse en la Tabla 2.4, las formulaciones tamponadas con histidina, particularmente a pH 6, mostraban los menores niveles de fragmentación.

20 Análisis de oxidación:

- 25 Se midieron los niveles de oxidación de restos de metionina en las posiciones aminoácidas X e Y en el anticuerpo anti-NGF E3 mediante un procedimiento de mapeo de Lisina-C después del almacenamiento a 5, 25 y 40°C durante 0, 4, 9 y 13 semanas. Las muestras de cada formulación ensayada se digirieron después con enzima Lyc-C en tampón tris a pH 8,0 en condiciones convencionales y se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa. La separación se logró usando una columna analítica de Proteína C4 Grace Vydae con elución en gradiente de TFA al 0,1% en agua y TFA al 0,085% en acetonitrilo. Se registró el porcentaje de oxidación de aminoácidos de metionina en el anticuerpo anti-NGF E3.

Los resultados de la Tabla 2.5 indican que el porcentaje de oxidación de la formulación de citrato es el mayor.

- 30 **Tabla 2.1. Tabla de Preparación de Tampón: Resumen de las cantidades de componentes de tampón registradas a partir de los registros de fabricación para preparar 250 ml de tampón.**

Número de Lote de Formulación	pH	Acetato (mg/ml)	Ácido Acético (mg/ml)	Histidina (mg/ml)	Histidina HCl (mg/ml)	Citrato (mg/ml)	Ácido Cítrico (mg/ml)	Succinato (mg/ml)	Ácido Succínico (mg/ml)
Acetato pH 5,0	5,0	435,58	104,14	--	--	--	--	--	--
Acetato pH 5,5	5,5	577,75	34,59	--	--	--	--	--	--
Acetato pH 6,0	6,0	644,28	15,07	--	--	--	--	--	--
Acetato pH 6,5	6,5	668,51	10,32	--	--	--	--	--	--
Histidina pH 5,0	5,0	--	--	70,45	839,27	--	--	--	--
Histidina pH 5,5	5,5	--	--	186,9	751,9	--	--	--	--
Histidina pH 6,0	6,0	--	--	387,5	454,1	--	--	--	--
Histidina pH 6,5	6,5	--	--	588,75	220,87	--	--	--	--
Citrato pH 5,0	5,0	--	--	--	--	233,63	107,18	--	--
Citrato pH 5,5	5,5	--	--	--	--	279,09	79,01	--	--
Citrato pH 6,0	6,0	--	--	--	--	321,25	42,51	--	--
Citrato pH 6,5	6,5	--	--	--	--	348,77	20,52	--	--
Succinato pH 5,0	5,0	--	--	--	--	--	--	585,18	176,86
Succinato pH 5,5	5,5	--	--	--	--	--	--	679,4	80,83
Succinato pH 6,0	6,0	--	--	--	--	--	--	756,23	34,73
Succinato pH 6,5	6,5	--	--	--	--	--	--	791,83	11,60

Tabla 2.2. Tabla de Matriz de Formulación:

Número de Lote de Formulación	pH	Con. AcM (mg/ml)	Acetato (mg/ml)	Ácido Acético (mg/ml)	Histidina (mg/ml)	Histidina HCl (mg/ml)	Citrato (mg/ml)	Ácido Cítrico (mg/ml)	Succinato (mg/ml)	Ácido Succínico (mg/ml)
Acetato pH 5,0	5,0	20	1,7423	0,4323	--	--	--	--	--	--
Acetato pH 5,5	5,5	20	2,3110	0,1813	--	--	--	--	--	--
Acetato pH 6,0	6,0	20	2,5771	0,0639	--	--	--	--	--	--
Acetato pH 6,5	6,5	20	2,6744	0,0210	--	--	--	--	--	--
Histidina pH 5,0	5,0	20	--	--	0,2818	3,8182	--	--	--	--
Histidina pH 5,5	5,5	20	--	--	0,7448	3,1909	--	--	--	--
Histidina pH 6,0	6,0	20	--	--	1,5500	2,1000	--	--	--	--
Histidina pH 6,5	6,5	20	--	--	2,3552	1,0091	--	--	--	--
Citrato pH 5,0	5,0	5	--	--	--	--	0,9345	0,3821	--	--
Citrato pH 5,5	5,5	5	--	--	--	--	1,1164	0,2530	--	--
Citrato pH 6,0	6,0	5	--	--	--	--	1,2850	0,1325	--	--
Citrato pH 6,5	6,5	5	--	--	--	--	1,3951	0,0538	--	--
Succinato pH 5,0	5,0	20	--	--	--	--	--	--	2,3407	0,6561
Succinato pH 5,5	5,5	20	--	--	--	--	--	--	2,7183	0,3809
Succinato pH 6,0	6,0	20	--	--	--	--	--	--	3,0249	0,1575
Succinato pH 6,5	6,5	20	--	--	--	--	--	--	3,1673	0,0537

Tabla 2.3. Resumen de los datos de % de Agregación (mediante CET) de anticuerpo anti-NGF 20 mg/ml: Estudio de Exploración de Tampón y pH

Condición	5°C		25°C			40°C			
Semanas	0	13	0	9	13	0	4	9	13
Nº Lote									
Acetato pH 5,0	1,6	1,8	1,6	2,2	2,5	1,6	3,2	5,1	8,1
Acetato pH 5,5	1,8	2,1	1,8	2,7	3,0	1,8	3,4	4,9	7,1
Acetato pH 6,0	2,0	2,4	2,0	3,2	3,3	2,0	4,3	5,5	7,0
Acetato pH 6,5	2,0	2,5	2,0	3,5	3,9	2,0	4,4	5,8	7,0
Histidina pH 5,0	1,6	1,8	1,6	2,0	2,3	1,6	2,7	3,9	7,0
Histidina pH 5,5	1,6	1,8	1,6	2,2	2,4	1,6	2,7	3,4	5,1
Histidina pH 6,0	1,8	2,1	1,8	2,5	2,7	1,8	3,0	3,5	4,8
Histidina pH 6,5	1,9	2,2	1,9	2,8	3,1	1,9	3,4	4,2	5,6
Citrato pH 5,0	1,6	1,9	1,6	2,4	2,8	1,6	4,6	8,5	15,0
Citrato pH 5,5	1,8	2,2	1,8	3,0	3,3	1,8	4,9	8,7	12,2
Citrato pH 6,0	2,0	2,5	2,0	3,3	3,7	2,0	4,4	6,5	8,4
Citrato pH 6,5	2,1	2,8	2,1	3,7	4,2	2,1	4,8	6,5	8,4
Succinato pH 5,0	1,6	1,9	1,6	2,3	2,7	1,6	3,5	6,1	11,2
Succinato pH 5,5	2,0	2,2	2,0	2,8	3,2	2,0	3,9	5,7	8,4
Succinato pH 6,0	1,8	2,5	1,8	3,1	3,6	1,8	4,3	5,8	7,8
Succinato pH 6,5	2,2	2,8	2,2	3,7	4,1	2,2	4,8	5,9	7,5

Tabla 2.4. Resumen de los datos de % de Fragmentación (mediante ECG reducido) de anticuerpo anti-NGF 20 mg/ml: Estudio de Exploración de Tampón y pH

Condición	5 C		25 C			40 C			
Semanas	0	13	0	9	13	0	4	9	13
Nº Lote									
Acetato pH 5,0	1,1	1,1	1,1	1,4	1,0	1,1	4,2	7,0	10,3
Acetato pH 5,5	1,1	1,0	1,1	1,0	1,7	1,1	4,4	5,2	9,4
Acetato pH 6,0	1,1	1,1	1,1	1,4	1,3	1,1	3,6	5,9	7,2
Acetato pH 6,5	1,1	1,2	1,1	1,0	2,2	1,1	4,1	6,4	8,1
Histidina pH 5,0	1,1	1,0	1,1	1,0	1,8	1,1	5,8	7,5	11,2
Histidina pH 5,5	1,1	1,1	1,1	0,9	1,5	1,1	4,3	6,4	7,9
Histidina pH 6,0	1,1	1,0	1,1	1,6	1,5	1,1	3,1	3,8	6,1
Histidina pH 6,5	1,0	1,2	1,0	1,6	2,2	1,0	3,7	6,1	9,7
Citrato pH 5,0	1,0	1,0	1,0	1,0	2,1	1,0	5,4	9,1	14,5
Citrato pH 5,5	1,0	1,1	1,0	1,1	1,4	1,0	4,6	7,6	11,5
Citrato pH 6,0	1,1	1,6	1,1	2,0	1,6	1,1	3,7	6,9	10,6
Citrato pH 6,5	1,5	1,0	1,5	1,3	9,1	1,5	3,4	8,2	10,9
Succinato pH 5,0	1,2	1,0	1,2	2,1	7,9	1,2	5,4	8,8	13,1
Succinato pH 5,5	1,2	1,5	1,2	0,9	0,9	1,2	3,1	5,8	9,0
Succinato pH 6,0	1,2	1,0	1,2	1,3	6,8	1,2	3	5,0	8,0
Succinato pH 6,5	1,2	1,1	1,2	1,5	11,8	1,2	3,5	7,2	8,0

Tabla 2.5. Resumen de los datos de % de Oxidación de anticuerpo anti-NGF 20 mg/ml: Estudio de Exploración de Tampón y pH

5

Condición	5 C			25 C			40 C			
Semanas	0	9	13	0	9	13	0	4	9	13
Nº Lote										
Acetato pH 5,0	2,8	2,1		2,8	2,3		2,8		3,3	4,1
Acetato pH 5,5	2,8	2,1		2,8	2,3		2,8		3,3	4,1
Acetato pH 6,0	2,3	2,0		2,3	2,2		2,3		3,1	3,4
Acetato pH 6,5	2,3	2,1		2,3	2,5		2,3		3,5	4,1
Histidina pH 5,0	2,2	2,0		2,2	2,5		2,2		4,1	6,4
Histidina pH 5,5	2,6	1,8		2,6	2,3		2,6		3,9	5,7
Histidina pH 6,0	2,0	1,9		2,0	2,3		2,0		3,9	6,1
Histidina pH 6,5	2,4	2,1		2,4	2,5		2,4		4,7	7,1
Citrato pH 5,0	2,1	2,1		2,1	2,8		2,1		7,2	9,7
Citrato pH 5,5	2,8	2,1		2,8	2,9		2,8		8,0	10,1
Citrato pH 6,0	2,4	1,8		2,4	2,7		2,4		6,6	7,9
Citrato pH 6,5	2,4	1,8		2,4	2,6		2,4		6,3	8,1
Succinato pH 5,0	3,9	1,8		3,9	2,2		3,9		4,0	5,5
Succinato pH 5,5	2,7	1,9		2,7	2,3		2,7		4,1	4,6
Succinato pH 6,0	2,1	2,1		2,1	2,1		2,1		3,8	3,4
Succinato pH 6,5	2,7	2,1		2,7	2,1		2,7		3,5	3,1

Ejemplo 3 Análisis de Agentes de Tonicidad, Trehalosa frente a Sacarosa frente a Sorbitol

Se realizó un estudio para comparar el efecto de agentes de tonicidad, en particular trehalosa, sacarosa y sorbitol, sobre la estabilidad de formulaciones de anticuerpo anti-NGF E3. En concreto, se prepararon tres formulaciones líquidas que comprendían anticuerpo anti-NGF E3 y trehalosa, sacarosa o sorbitol como se enumeran en la Tabla 3.1. Las formulaciones se almacenaron después a 5, 25 y 40°C y se tomaron mediciones de la agregación, fragmentación y oxidación de anticuerpo a las 2, 4, 8, 13 y 26 semanas.

El procedimiento de fabricación para formulaciones en la Tabla 3.1 puede resumirse de la forma siguiente: se prepara el tampón, se ajusta el pH y se esteriliza por filtración (véase la Tabla 3.1 para detalles). Se preparan soluciones madre de excipientes y se esterilizan por filtración. El anticuerpo se concentra y después se cambia el tampón. El anticuerpo concentrado se analiza con UV y después se diluye con el tampón respectivo hasta 50 mg/ml y los excipientes respectivos combinados a la concentración necesaria. Después, la solución de 50 mg/ml se esteriliza por filtración. Por último, la solución estéril se rellena, se tapona y se cubre con un sello de aluminio. Todas las formulaciones tienen un pH de 6,0 y una concentración de anticuerpo anti-NGF E3 de 50 mg/ml.

Análisis de Agregación:

Las formulaciones de anticuerpo de la Tabla 3.1 se almacenaron a una temperatura de 5, 25 y 40°C durante 2, 4, 8, 13 y 26 semanas.

Cada formulación se analizó para determinar su agregación usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2. Se calcularon los niveles de agregación y se muestran en la Figura 1.

Análisis de Fragmentación:

Las formulaciones de anticuerpo de la Tabla 3.1 se almacenaron a una temperatura de 5, 25 y 40°C durante 2, 4, 8, 13 y 26 semanas.

Cada formulación se analizó también para determinar la fragmentación usando la metodología del Ejemplo 2. Como puede observarse en la Figura 2, la formulación de trehalosa mostraba los menores niveles de fragmentación en el almacenamiento de 13 semanas.

Tabla 3.1 Matriz de Formulación

Número de Lote de Formulación	pH	Conc. AcM (mg/ml)	Histidina (mM)	Trehalosa (mg/ml)	Sacarosa (mg/ml)	Sorbitol (mg/ml)
114069-001-A#	6,0	50	10	84	-	-
114069-001-B#	6,0	50	10	-	80	-
114069-001-C#	6,0	50	10	-	-	40

Ejemplo 4 Estudio de Exploración de Agente de Tonicidad: Trehalosa frente a Sacarosa

Se realizó un estudio para comparar el efecto de agentes de tonicidad, en particular trehalosa y sacarosa, sobre la estabilidad y actividad de formulaciones de anticuerpo anti-NGF E3. La hidrólisis de la sacarosa en fructosa y glucosa en una solución ácida diluida es bien conocida. También se sabe que las moléculas de glucosa se unen aleatoriamente con los restos de lisina de la secuencia de aminoácidos de una proteína. Esto se conoce como glucosilación. Por lo tanto, una formulación de proteína, tamponada a un pH ácido, que contiene sacarosa, podría experimentar hidrólisis de sacarosa y después glucosilación. La proteína glucosilada podría experimentar procesos de degradación más fácilmente que una proteína no glucosilada. Por lo tanto, la presencia de sacarosa en una formulación líquida de proteína podría tener un impacto adverso sobre la calidad de la proteína a lo largo de su vida útil. Por el contrario, no se sabe que la trehalosa experimente dicha degradación basada en hidrólisis, y puede ser un agente modificador de la tonicidad preferente en formulaciones de proteínas.

En concreto, se prepararon seis formulaciones líquidas que comprendían anticuerpo anti-NGF E3 con sacarosa y dos formulaciones líquidas que comprendían anticuerpo anti-NGF E3 y trehalosa, véase la Tabla 4.1. Las formulaciones se almacenaron después a 5, 25 y 40°C y se tomaron mediciones de la agregación y glucosilación del anticuerpo a las 2, 4, 8, 13 y 26 semanas.

El procedimiento de fabricación para formulaciones en la Tabla 4.1 puede resumirse de la forma siguiente: se prepara el tampón, se ajusta el pH y se esteriliza por filtración (véase la Tabla 4.1 para detalles). Se preparan soluciones madre de excipientes y se esterilizan por filtración. El anticuerpo se concentra, después se cambia el tampón. El anticuerpo concentrado se analiza con UV y después se diluye con el tampón respectivo hasta 10 mg/ml o 50 mg/ml y los excipientes respectivos combinados a la concentración necesaria. Después, la solución de 10 mg/ml o 50 mg/ml se esteriliza por filtración. Por último, la solución estéril se rellena, se tapona y se cubre con un sello de aluminio.

Análisis de Agregación:

Las formulaciones de anticuerpo de la Tabla 4.1 se almacenaron a una temperatura de 5, 25, 40 y 50°C durante 2, 4, 8, 13 y 26 semanas.

- 5 Cada formulación se analizó para determinar la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño (CET) como se describe en el Ejemplo 2. Los niveles de agregación calculados se comparan en la Tabla 4.2 y muestran que la trehalosa demuestra niveles tan bajos sino menores de agregación en comparación con la sacarosa para las mismas concentraciones de anticuerpo investigadas.

Análisis de Glucosilación:

- 10 Los niveles de glucosilación de restos de lisina en el anticuerpo anti- NGF E3 se midieron mediante un procedimiento de mapeo por espectrometría de masas después del almacenamiento de las formulaciones a 25, 40 y 50°C durante 0, 2, 4, 8 y 13 semanas para muestras de formulación que comprenden agente de tonicidad de sacarosa o trehalosa de acuerdo con la Tabla 4.1 (anticuerpo 10 mg/ml, histidina 10 mM, pH 6,0). Se descubrió que la glucosilación era proporcional al índice de hidrólisis del agente de tonicidad. No se demostró hidrólisis de trehalosa, por lo tanto la trehalosa es un agente de tonicidad preferido sobre la sacarosa para la formulación de anticuerpo ya que se evita la glucosilación del anticuerpo de formulación, la sacarosa demostró una hidrólisis de entre el 1% y el 2% en formulaciones almacenadas a 25°C durante 104 semanas.

Tabla 4.1. Tabla de Matriz de Formulación para el Ejemplo 4

Número de Lote de Formulación	pH	Conc. AcM (mg/ml)	Histidina (mg/ml)	Histidina HCl (mg/ml)	Sacarosa (mg/ml)	Trehalosa (mg/ml)	Glucosa (mg/ml)	Fructosa (mg/ml)	Metionina (mg/ml)	EDTA (mg/ml)	PS20 (mg/ml)
112633-174	6,0	10	0,8206	0,9879	94	--	--	--	--	--	0,1
112633-175	6,0	10	0,8206	0,9879	94	--	--	--	--	0,05	0,1
112633-176	6,0	10	0,8206	0,9879	94	--	--	--	0,1	0,05	0,1
112633-177	6,0	10	0,8206	0,9879	94	--	--	--	0,1	--	0,1
112633-178	5,7	10	0,5586	1,3418	94	--	--	--	--	--	0,1
112633-179	5,7	10	0,5586	1,3418	94	--	--	--	--	0,05	0,1
112633-180	6,0	10	0,8206	0,9879	--	84	--	--	--	0,05	0,1
112633-181	5,7	10	0,5586	1,3418	--	84	--	--	--	0,05	0,1
112633-182	6,0	10	0,8206	1,3418	--	--	49,5	49,5	--	0,05	0,1

Tabla 4.2. Resumen de los datos de % de Agregación (mediante CET) de anticuerpo anti-NGF 10 mg/ml: Comparación de sacarosa frente a trehalosa

20

Condición	25°C			40°C			50°C		
	0	4	12	0	4	12	0	4	12
Nº lote									
112633-174	0,5	0,5	0,8	0,5	1,0	1,9	0,5	4,3	20,4
112633-175	0,5	0,6	0,6	0,5	0,7	1,4	0,5	3,2	19,2
112633-176	0,5	0,6	0,7	0,5	0,7	1,2	0,5	2,9	13,5
112633-177	0,5	0,6	0,6	0,5	0,8	1,2	0,5	2,8	13,2
112633-178	0,5	0,5	0,6	0,5	1,0	1,8	0,5	4,6	24,8
112633-179	0,5	0,5	0,6	0,5	0,7	1,4	0,5	3,6	20,0
112633-180	0,5	0,6	0,7	0,5	0,8	1,6	0,5	3,1	11,4
112633-181	0,5	0,5	0,6	0,5	0,7	1,7	0,5	3,7	12,5
112633-182	0,5	0,6	0,9	0,5	1,7	12,1	0,5		

Tabla 4.3. Resumen de los Datos de Glucosilación del anticuerpo anti-NGF (descrita como % cadena pesada + 162 Daltons) de anticuerpo anti-NGF 10 mg/ml: Comparación de sacarosa frente a trehalosa

Condición	25°C			40°C			50°C			
semanas	0	4	12	0	4	12	0	4	9	12
Nº lote										
112633-174	0	--	--	0	--	4	0	3	19	23
112633-175	0	--	--	0	--	4	0	4	22	29
112633-176	0	--	--	0	--	3	0	4	13	17
112633-177	0	--	--	0	--	3	0	4	14	18
112633-178	0	--	--	0	--	4	0	7	29	49
112633-179	0	--	--	0	--	4	0	7	30	52
112633-180	0	--	--	0	--	--	0	--	--	--
112633-181	0	--	--	0	--	--	0	1	--	--
112633-182	19	67	--	19	92	60	19			100

Ejemplo 5 Análisis de agentes tensioactivos y estabilizantes poliméricos

- 5 Se realizó un estudio para comparar el efecto de tensioactivos y estabilizantes poliméricos, en particular PS20, PS80, PEG3350, PEG3350+PS20 sobre la estabilidad de formulaciones de anticuerpo anti-NGF E3.

10 En concreto, se prepararon cuatro formulaciones líquidas que comprendían anticuerpo anti-NGF E3 y PS20, PS80, PEG3350, PEG3350+PS20 como se enumeran en la Tabla 5.1. Las formulaciones se almacenaron después a 5, 25 y 40°C y se tomaron mediciones de la agregación, fragmentación y oxidación de anticuerpo a las 2, 4, 8, 13 y 26 semanas.

15 Todas las formulaciones tenían un pH de 6,0 y una concentración de anticuerpo anti-NGF E3 de 50 mg/ml. El procedimiento de fabricación para las formulaciones en la Tabla 5.1 puede resumirse de la forma siguiente: se prepara el tampón, se ajusta el pH y se esteriliza por filtración (véase la Tabla 5.1 para detalles). Se preparan soluciones madre de excipientes y se esterilizan por filtración. El anticuerpo se concentra y después se cambia el tampón. El anticuerpo concentrado se analiza con UV y después se diluye con el tampón respectivo hasta 50 mg/ml y los excipientes respectivos combinados a la concentración necesaria. Después, la solución de 50 mg/ml se esteriliza por filtración. Por último, la solución estéril se rellena, se tapona y se cubre con un sello de aluminio. Las Tablas 5.2 y 5.3 describen los resultados.

Análisis de Agregación:

- 20 Las formulaciones de anticuerpo de la Tabla 5.1 se almacenaron a una temperatura de 5, 25, 40 y 50°C durante 2, 4, 8, 13 y 26 semanas.

25 Cada formulación se analizó para determinar la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño (CET) como se describe en el Ejemplo 2. Los niveles de agregación calculados se comparan en la Tabla 5.2 y muestran que el PS20 a una concentración de 0,2 mg/ml demuestra niveles equivalentes de agregación en comparación con el PS80 de 0,2 mg/ml y PEG3350 1 mg/ml investigados. El PS20 a una concentración de 0,1 mg/ml también demuestra resultados equivalentes (datos de 40°C)

Análisis de la Fragmentación:

- 30 Las formulaciones de anticuerpo de la Tabla 5.1 se almacenaron a una temperatura de 5, 25, y 40°C durante 2, 4, 8, 13 y 26 semanas.

35 Cada formulación se analizó para determinar la fragmentación usando la metodología del Ejemplo 2. Los datos recogidos de las muestras a 40°C se muestran en la Tabla 5.3 y muestran que el PS20 a una concentración de 0,2 mg/ml demuestra niveles equivalentes de fragmentación en comparación con el PS80 de 0,2 mg/ml y el PEG3350 1 mg/ml investigados. También se mostró que el PS20 a una concentración de 0,1 mg/ml demuestra resultados equivalentes.

Tabla 5.1 Matriz de Formulación para Estudio de Exploración de Agente Tensioactivo

Número de Lote de Formulación	pH	Conc. AcM (mg/ml)	Histidina (mM)	PS20 (mg/ml)	PS80 (mg/ml)	PEG 3350 (mg/ml)	PS20 + PEG 3350
114069-001-D#	6,0	50	10	0,2	-	-	-
114069-001-E#	6,0	50	10	-	0,2	-	-
114069-001-F#	6,0	50	10	-	-	10	-
114069-001-G#	6,0	50	10	-	-	-	0,2 + 1

Tabla 5.2. Resumen de los datos de % de Agregación (mediante CET) de anticuerpo anti-NGF 50 mg/ml: Estudio de Exploración de Agente Tensioactivo

			25C				40C				
	Semanas	T0	4	8	13	26	2	4	8	13	26
114069-001-D2	PS20	1	1,4	1,5	1,8	2,4	1,8	2,2	2,8	4,2	8,2
114069-001-E2	PS80	0,9	1,3	1,5	1,8	n/a	1,8	2,2	3,1	4,2	n/a
114069-001-F2	PEG3350	1	1,4	1,5	1,9	n/a	1,8	2,2	2,8	3,9	n/a
114069-001-G2	PS20+PEG3350	0,9	1,3	1,5	1,9	n/a	1,8	2,1	3	4,3	n/a

5

Tabla 5.3. Resumen de los Datos de % Fragmentos (mediante ECG reducido) de anticuerpo anti-NGF 50 mg/ml: Estudio de Exploración de Tensioactivo

			25C				40C				
	Semanas	T0	4	8	13	26	2	4	8	13	26
114069-001-D2	PS20	0,9	0,8	1,3	2,3	3,1	1,3	2,6	5,5	7,1	13,6
114069-001-E2	PS80	0,9	0,7	0,9	1,7	n/a	1,4	1,7	6,4	6,5	n/a
114069-001-F2	PEG3350	0,9	0,8	1,6	2,3	n/a	1,6	1,8	4,5	7	n/a
114069-001-G2	PS20+PEG3350	0,8	0,7	1	2,3	n/a	1,3	1,2	4,9	7,9	n/a

Ejemplo 6: Análisis de agentes antioxidantes

- 10 Se realiza un estudio para comparar el efecto de agentes antioxidantes, en particular metionina, sobre la estabilidad de formulaciones de anticuerpo anti-NGF E3.

En concreto, se prepararon nueve formulaciones líquidas que comprendían anticuerpo anti-NGF E3 con y sin metionina. Todas las formulaciones tenían un pH de 6,0 y una concentración de anticuerpo anti-NGF E3 de 10 o 50 mg/ml, trehalosa o sacarosa 84 mg/ml y PS20 0,1 mg/ml, histidina 10 mM, más o menos EDTA 0,05 mg/ml.

- 15 El procedimiento de fabricación para formulaciones puede resumirse de la forma siguiente: se prepara el tampón, se ajusta el pH y se esteriliza por filtración. Se preparan soluciones madre de excipientes y se esterilizan por filtración. El anticuerpo se concentra, después se cambia el tampón. El anticuerpo concentrado se analiza con UV y después se diluye con el tampón respectivo hasta 10 o 50 mg/ml y los excipientes respectivos combinados a la concentración necesaria. Después, la solución de 10 mg/ml o 50 mg/ml se esteriliza por filtración. Por último, la solución estéril se rellena, se tapona y se cubre con un sello de aluminio.
- 20

Las formulaciones se almacenan después a 5, 25 y 40°C y se toman mediciones de la agregación, fragmentación y oxidación de anticuerpo a las 2, 4, 8, 13, 26 y 52 semanas.

Análisis de Agregación:

- 25 Las formulaciones de anticuerpo se almacenaron a una temperatura de 5, 25 y 40°C durante 0, 8, 13, 26 y 52 semanas.

Cada formulación se analizó para determinar la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño (CET) como se describe en el Ejemplo 2. Se compararon los niveles de agregación calculados y se descubrió que eran significativamente diferentes para muestras almacenadas a 5 o 25°C durante 26 semanas con o sin metionina, la presencia de metionina no tiene un efecto discernible sobre la agregación.

5 **Análisis de Fragmentación:**

Las formulaciones de anticuerpo se almacenaron a una temperatura de 5, 25 y 40°C durante 0, 8, 13 y 26 semanas, se tomaron medidas de la fragmentación a las 26 semanas.

10 Cada formulación se analizó para determinar la fragmentación usando la metodología del Ejemplo 2. Se compararon los niveles de fragmentación calculados y se descubrió que eran significativamente diferentes para las muestras almacenadas a 5 o 25°C durante 26 semanas con o sin metionina, la presencia de metionina no tiene ningún efecto discernible sobre la fragmentación.

Análisis de oxidación:

15 Se midieron los niveles de oxidación de los restos de metionina en las posiciones aminoácidas X e Y en el anticuerpo anti-NGF E3 mediante un procedimiento de mapeo de Lisina-C después del almacenamiento a 5, 25 y 40°C durante 0, 13, 26 y 52 semanas. Se registró el porcentaje de oxidación de aminoácidos de metionina en el anticuerpo anti-NGF E3 como se describe en el Ejemplo 2.

Los resultados de la Tabla 6.1 indican que el porcentaje de oxidación del anticuerpo se reduce por presencia de metionina en periodos de almacenamiento más prolongados.

20 **Tabla 6.1. Resumen de los Datos de % de Oxidación de anticuerpo anti-NGF 10 y 50 mg/ml: Estudio de Exploración de Agente Antioxidante**

Semanas	25°C				40°C		
	0	13	26	52	13	26	52
Histidina 10 mM + Sac + PS20 + AcM 10 mg/ml		3,50	3,40	4,70	7,80	21,00	51,60
Histidina 10 mM + Sac + PS20 + EDTA + Met + AcM 10 mg/ml		4,70	3,20	0,00	7,00	10,90	0,00
Histidina 10 mM + Sac + PS20 + AcM 50 mg/ml	1,77	3,90	3,80	5,50	8,40	15,50	39,20
Histidina 10 mM + Sac + PS20 + EDTA + Met + AcM 50 mg/ml	1,72	2,70	3,40	3,10	5,10	10,10	30,60
Histidina 10 mM + Tre + PS20 + AcM 50 mg/ml	1,79	3,40	3,80	5,80	6,80	15,00	30,00
Histidina 10 mM + Tre + PS20 + EDTA + AcM 50 mg/ml	1,65	3,30	4,00	5,90	6,60	11,20	20,20
Histidina 10 mM + Tre + PS20 + Met + AcM 50 mg/ml	1,72	2,70	2,80	2,60	3,90	6,50	14,40
Histidina 10 mM + Tre + PS20 + EDTA + Met + AcM 50 mg/ml	1,70	2,70	3,30	3,10	4,60	7,00	14,00
Histidina 10 mM + Tre + PS20 + EDTA + Met + AcM 10 mg/ml	0,00	4,10	3,30	3,30	6,20	6,80	12,60

Ejemplo 7 Estudio de Estabilidad a la Congelación-Descongelación con y sin Trehalosa

25 Se prepararon formulaciones de anticuerpo que comprendían anticuerpo anti-NGF E3 50 mg/ml, tampón histidina 10 mM pH 6,0 y trehalosa 84 mg/ml, y se prepararon muestras idénticas que carecían de trehalosa. Las muestras se sometieron a hasta 4 ciclos de congelación y descongelación y se determinó la agregación para las muestras. Los ciclos de congelación-descongelación son de congelación 72 h a -70°C y descongelación 48 h a 5°C.

30 Cada formulación se analizó para determinar la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño (CET) como se describe en el Ejemplo 2. Los niveles de agregación calculados se comparan en la Tabla 7.1 y muestran que las muestras que comprenden trehalosa ofrecen una protección completa frente a los efectos de la congelación-descongelación sobre la agregación del anticuerpo. Las muestras con trehalosa no muestran un aumento apreciable en el nivel de agregación con el tiempo.

Tabla 7.1 Resumen de los Datos de % de Agregación (mediante CET) de anticuerpo anti-NGF 50 mg/ml:

Ciclo de Congelación/Descongelación	%HMMS de Muestra de Control (sin Trehalosa)	%HMMS de Muestra con Trehalosa
0	0,60	0,60
1	0,75	0,60
2	0,90	0,60

(continuación)

Ciclo de Congelación/Descongelación	%HMMS de Muestra de Control (sin Trehalosa)	%HMMS de Muestra con Trehalosa
3	1,00	0,60
4	1,30	0,60

Ejemplo 8 Estabilidad a Múltiple Congelación-Descongelación de la Formulación de Anticuerpo anti-NGF E3 con Trehalosa

5 Se prepararon formulaciones de anticuerpo (112746-124 y 112746-125) que comprendían anticuerpo anti-NGF E3 22 mg/ml, tampón de histidina 10 mM pH 6,0 y trehalosa 84 mg/ml, EDTA disódico 0,05 mg/ml y polisorbato 20 0,1 mg/ml. Las muestras se sometieron a hasta 15 ciclos de congelación y descongelación y se determinó la agregación para las muestras.

10 Cada formulación se analizó para determinar la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño (CET) como se describe en el Ejemplo 2. Los niveles de agregación calculados se comparan en la Figura 3 y muestran que todas las muestras que comprenden trehalosa ofrecen una protección completa frente a los efectos de la congelación y descongelación sobre la agregación del anticuerpo. Las muestras con trehalosa no muestran un aumento apreciable en el nivel de agregación con el tiempo.

15 **Ejemplo 9: Estudio de Estabilidad a Largo Plazo en anticuerpo anti-NGF E3 10 y 50 mg/ml: Efecto de la Trehalosa como estabilizante**

20 Se prepararon formulaciones de anticuerpo que comprendían anticuerpo anti-NGF E3 10 mg/ml, tampón de histidina 10 mM pH 6,0 y trehalosa 84 mg/ml, se prepararon muestras idénticas que carecían de trehalosa. Los detalles de las muestras estudiadas se proporcionan en la Tabla 9.1. Las muestras se almacenaron a una temperatura de 5, 25 y 40°C durante 2, 4, 8, 13, 26 y 52 semanas y se determinó la agregación para las muestras. Cada formulación se analizó para determinar la agregación usando cromatografía de exclusión por tamaño (CET) como se describe en el Ejemplo 2. Los datos recogidos mostraban que las muestras que comprenden trehalosa ofrecen altos niveles de protección frente a los efectos sobre la agregación del anticuerpo en el almacenamiento en condiciones aceleradas de 40°C.

Tabla 9.1 Matriz de Formulación para Estudio de Estabilidad a Largo Plazo en anticuerpo anti-NGF E3 10 y 50 mg/ml: Efecto de la Trehalosa como estabilizante

Número de Lote de Formulación	pH	PF-04383119 (mg/ml)	Histidina mM	Sacarosa (mg/ml)	Trehalosa (mg/ml)	PS20 (mg/ml)	Metionina (mg/ml)	EDTA (mg/ml)
112746-27-1	6,0	10	10	94	-	0,1	-	-
112746-27-2	6,0	10	10	94	-	0,1	0,1	0,05
112746-27-3	6,0	50	10	94	-	0,1	-	-
112746-27-4	6,0	50	10	94	-	0,1	0,1	0,05
112746-27-5	6,0	50	10	-	84	0,1	-	-
112746-27-6	6,0	50	10	-	84	0,1	-	0,05
112746-27-7	6,0	50	10	-	84	0,1	0,1	-
112746-27-8	6,0	50	10	-	84	0,1	0,1	0,05
112746-27-9	6,0	10	10	-	84	0,1	0,1	0,05

Tabla 9.2 Datos de % de Agregación (mediante CET) a 40°C durante el Estudio de Estabilidad a Largo Plazo en anticuerpo anti-NGF E3 10 y 50 mg/ml: Efecto de la Trehalosa como estabilizante

Composición	ID de Muestra	Tiempo (semanas)						
		0	2	4	8	13	26	52
Histidina 10 mM + Sac + PS20 + AcM 10 mg/ml	112746-27-1	0,60	0,70	0,90	1,2	1,7	4,80	22,10
Histidina 10 mM + Sac + PS20 + EDTA + Met + AcM 10 mg/ml	112746-27-2	0,60	0,70	0,90	1,2	1,5	3,40	NA
Histidina 10 mM + Sac + PS20 + AcM 50 mg/ml	112746-27-3	0,60	1,60	2,00	2,8	3,7	7,50	20,70
Histidina 10 mM + Sac + PS20 + EDTA + Met + AcM 50 mg/ml	112746-27-4	0,60	1,50	1,80	2,4	3,2	6,00	22,40
Histidina 10 mM + Tre + PS20 + AcM 50 mg/ml	112746-27-5	0,60	1,70	1,90	2,9	3,8	7,60	16,20
Histidina 10 mM + Tre + PS20 + EDTA + AcM 50 mg/ml	112746-27-6	0,60	1,70	2,00	2,6	3,3	5,40	13,20
Histidina 10 mM + Tre + PS20 + Met + AcM 50 mg/ml	112746-27-7	0,60	1,60	1,80	2,5	3,2	5,40	12,60
Histidina 10 mM + Tre + PS20 + EDTA + Met + AcM 50 mg/ml	112746-27-8	0,60	1,60	1,80	2,5	3,1	4,80	11,60
Histidina 10 mM + Tre + PS20 + EDTA + Met + AcM 10 mg/ml	112746-27-9	0,60	0,90	1,00	1,4	1,8	3,10	7,00

Ejemplo 10: Estudio de la Estabilidad a Largo Plazo de una formulación de anticuerpo anti-NGF E3 que contiene trehalosa, EDTA, polisorbato 20 en tampón de histidina a pH 6,0 a 2,5, 5, 10, 20 y 50 mg/ml

Se prepararon formulaciones de anticuerpo que comprendían anticuerpo anti-NGF E3 2,5 o 5 o 10 o 20 o 50 mg/ml, tampón de histidina 10 mM pH 6,0 y trehalosa 84 mg/ml, EDTA 0,05 mg/ml y polisorbato 20 0,1 mg/ml. Las muestras se almacenaron a una temperatura de entre 5 y 8°C durante hasta 24 meses y más, y se determinó la agregación, fragmentación y oxidación para las muestras.

Los datos recogidos y presentados en las Figuras 4, 5 y 6 indican que dicha formulación de anticuerpo anti-NGF E3 a una concentración de AcM de 2,5, 5, 10, 20 o 50 mg/ml es estable durante hasta 52 semanas.

Un ejemplo de una composición líquida de anticuerpo de acuerdo con la presente invención es el siguiente:

cualquiera de aproximadamente 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 22 mg/ml o aproximadamente 50 mg/ml de un anticuerpo que comprende una secuencia variable de cadena pesada de SEC ID N°: 1 y una secuencia variable de cadena ligera de SEC ID N°: 2, tampón de histidina aproximadamente 10 mM, trehalosa dihidrato aproximadamente 84 mg/ml, Polisorbato 20 aproximadamente 0,01 peso/volumen, EDTA disódico aproximadamente al 0,005%, en el que dicha composición es de un pH de 6,0 +/- 0,2. La composición líquida de anticuerpo es preferentemente de un volumen total de aproximadamente 1 ml.

Secuencias de Anticuerpo

Región variable de cadena pesada de E3 (las CDR de Kabat están subrayadas; las CDR de Chothia están en **NEGRITA Y CURSIVA**)

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTT
DYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFDYWG
 QGTLVTVS (SEQ ID NO:1)

Región variable de cadena ligera de E3 (las CDR de Kabat están subrayadas; las CDR de Chothia están en **NEGRITA Y CURSIVA**)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSI~~SN~~NLMWYQQKPGKAPKLLIY**YTSRFHSG**
 VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYC**QQEHTLPYTF**GGGTKLEIKRT (SEQ ID NO:2)

CDR extendidas de cadena pesada de E3

CDRH1: GFSLIGYDLN (SEQ ID NO:3)

CDRH2: IIWGDGTTDYN SAVKS (SEQ ID NO:4)

CDRH3: GGYWYATSYFFDY (SEQ ID NO:5)

5 CDR extendidas de cadena ligera de E3

CDRL1: RASQSI NN LN (SEQ ID NO:6)

CDRL2: YTSRFHS (SEQ ID NO:7)

CDRL3: QQEHTLPYT (SEQ ID NO:8)

CDR extendidas de anticuerpo monoclonal de ratón 911

10 CDR extendidas de cadena pesada de 911

CDRH1 : GFSLIGYDIN (SEQ ID NO:9)

CDRH2 : MIWGDGTTDYN SALKS (SEQ ID NO:10)

CDRH3: GGYYYGTSYFFDY (SEQ ID NO:11)

CDR extendidas de cadena ligera de 911

15 CDRL1: RASQDISNHLN (SEQ ID NO:12)

CDRL2: YISRFHS (SEQ ID NO:13)

CDRL3: QQSKTLPYT (SEQ ID NO:14)

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de E3 (completa)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGT
TDYN SAVKSRVTISKDT SKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYW
GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERK
CCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTT PMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK(SEQ ID NO:16)

20 Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 3E (anticuerpo completo)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI NN LN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHS
GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPED IATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID
NO:17)

Secuencias de CDR adicionales distintas a las que se hace referencia

RASQSI NN LN (SEQ ID NO:18)

YTSRFHS (SEQ ID NO:19)

5 GFSLIGYDLN (SEQ ID NO:30)
 IIWGDGTTDYN SAV (SEQ ID NO:31)
 QQEHTLPYT (SEQ ID NO:55)
 GGYWYATSYFDY (SEQ ID NO:56)
 QQUESTLPYT (SEQ ID NO:57)
 GGYWYSTSYFDY (SEQ ID NO:58)
 QQEKTLPYT (SEQ ID NO:59)
 GGYYYATSYFDY (SEQ ID NO:60)
 QQERTLPYT (SEQ ID NO:61)
 10 GGYWYATSYFDY (SEQ ID NO:62)
 QQERTLPYT (SEQ ID NO:63)
 GGYYYATSYFDY (SEQ ID NO:64)

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 3E (anticuerpo completo)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCC
 TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTATGATCTTAACT
 GGATCCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGG
 TGATGGAACACAGACTATAATTCAGCTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAA
 AGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGG
 ACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTAC
 TACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCAC
 CAAGGGCCCATCTGTCTTCCCACTGGCCCCATGCTCCCGCAGCACCTCCGAGA
 GCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGAC
 CGTGTCTGGAAGTCTGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAGCTG
 TCCTGCAGTCCTCAGGTCTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCATCC
 AGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAAGCAA
 CACCAAGGTCGACAAGACCGTGGAGAGAAAGTGTTGTGTGGAGTGTCCACCTT
 GTCCAGCCCCTCCAGTGGCCGGACCATCCGTGTTCCCTGTTCCCTCCAAAGCCA
 AAGGACACCCTGATGATCTCCAGAACCCCAGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGG
 CGTGTCCACGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTATGTGGACGGAGTG
 GAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAAGAGAGGAGCAGTTCAACTCCACCTT
 CAGAGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGAAAG
 GAGTATAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGGACTGCCATCCAGCATCGAGAAGAC
 CATCTCCAAGACCAAGGGACAGCCAAGAGAGCCACAGGTGTATACCCTGCCAC
 CATCCAGAGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG
 GGATTCTATCCATCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCAGA
 GAACA ACTATAAGACCACCCCTCCAATGCTGGACTCCGACGGATCCTTCTTCCT
 GTATTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTGTTCT
 CTTGTTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTATACCCAGAAGAGCCTG
 TCCCTGTCTCCAGGAAAGTAA (SEQ ID NO: 65)

15 *Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la cadena pesada de 3E*

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCCGAGACCC
TGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGGTTCTCACTTATCGGCTATGATCTTAACT
GGATCCGACAGCCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGATTATCTGGGG
TGATGGAACCACAGACTATAATTCACTGTCAAATCCCGCGTCACCATCTCAAA
AGACACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGG
ACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGTTATTGGTACGCCACTAGCTAC
TACTTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA(SEQ ID
NO:66)

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de 3E (anticuerpo completo)

GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCG
CGTCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTA
TCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACCTGATCTACTACACCTCACGCT
TCCACTCAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTCA
CCTTCACCATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAAC
AGGAGCATACCCTTCCATATACCTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAA
CGCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTTCCTCCATCTGATGAGCAGTTG
AAATCCGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCACGCGAG
GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAACTCCCAGGA
GAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
CTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACMAAGTCTACGCCTGCGAAGT
CACCCATCAGGGCCTGAGTTCTCCAGTCACAAAGAGCTTCAACCGCGGTGAGT
GCTAA(SEQ ID NO:67)

Secuencia de nucleótidos del dominio variable de la cadena ligera de 3E

5 GATATCCAGATGACACAGTCCCCATCCTCCCTGTCTGCCTCTGTGGGTGACCG
CGTCACCATCACCTGCCGCGCATCTCAGTCCATTAGCAATAATCTGAACTGGTA
TCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCCCCAAAACCTGATCTACTACACCTCACGCT
TCCACTCAGGTGTCCCATCACGCTTCAGTGGCAGTGGCTCTGGTACAGATTTCA
CCTTCACCATTAGCAGCCTGCAACCAGAAGATATTGCCACTTATTACTGCCAAC
AGGAGCATACCCTTCCATATACCTTCGGTCAAGGCACCAAGCTGGAGATCAAA
CGC(SEQ ID NO:68)

Las secuencias anteriores y otras secuencias descritas en el presente documento se proporcionan en la lista de secuencias adjunta.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

<110> PFIZER INC.

<120> FORMULACIÓN LÍQUIDA ESTABLE DE ANTICUERPOS

Badkar, Advait

Bohack, Leigh

King, Kevin

Alanta L. Lary

<130> PC33665A

<150> US61/098305

<151> 19-09-2008

<160> 77

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr
			20					25					30		
Asp	Leu	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Ile	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Val	Lys
	50					55					60				
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65					70					75					80
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
			85					90					95		
Arg	Gly	Gly	Tyr	Trp	Tyr	Ala	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser								
		115					120								

<210> 2

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 2

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

ES 2 658 596 T3

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

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

<220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 3

Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr	Asp	Leu	Asn
1				5				10	

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

<220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 5

Gly	Gly	Tyr	Trp	Tyr	Ala	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5				10				

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

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 6

ES 2 658 596 T3

	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Asn	Asn	Leu	Asn					
	1				5					10						
5	<210> 7 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
10	<220> <223> Construcción sintética <400> 7															
				Tyr	Thr	Ser	Arg	Phe	His	Ser						
				1				5								
15	<210> 8 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial															
20	<220> <223> Construcción sintética <400> 8															
			Gln	Gln	Glu	His	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr					
25			1				5									
30	<210> 9 <211> 10 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i> <400> 9															
			Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr	Asp	Ile	Asn				
35			1				5				10					
40	<210> 10 <211> 16 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i> <400> 10															
	Met	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys	Ser
	1				5					10					15	
45	<210> 11 <211> 13 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>															
50	<400> 11															
		Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr		
		1				5						10				
55	<210> 12 <211> 11 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>															

ES 2 658 596 T3

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn His Leu Asn
1 5 10

5 <210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 13

Tyr Ile Ser Arg Phe His Ser
1 5

15 <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 14

Gln Gln Ser Lys Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

25 <210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

35 <210> 16
<211> 447
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 16

ES 2 658 596 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr
			20					25					30		
Asp	Leu	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Ile	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Val	Lys
	50					55					60				
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65					70					75					80
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Gly	Gly	Tyr	Trp	Tyr	Ala	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
		115					120					125			
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala
	130					135					140				
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145					150					155					160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165					170					175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
			180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His
		195					200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys
	210					215					220				
Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val
225					230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
		275					280					285			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser
	290					295					300				
Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325					330					335	
Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
			340					345					350		
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
		355					360					365			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
	370					375					380				
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser
385				390						395					400
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
				405					410					415	
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
			420					425					430		
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
		435					440					445			

	<210> 17	
	<211> 214	
	<212> PRT	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
10	<400> 17	
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn	
	20 25 30	
	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
	35 40 45	
	Tyr Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60	
	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
	65 70 75 80	
	Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Glu His Thr Leu Pro Tyr	
	85 90 95	
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr 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	
15	<210> 18	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Construcción sintética	
	<400> 18	
	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asn Leu Asn	
	1 5 10	
25	<210> 19	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Construcción sintética	

ES 2 658 596 T3

<400> 19

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser
1 5

5 <210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 20

Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Asn His Leu Asn
1 5 10

15 <210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

25 <400> 21

Tyr Thr Ser Arg Phe His Ser
1 5

30 <210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Gln Leu Asn
1 5 10

40 <210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 23

50 Tyr Val Ser Arg Phe His Ser
1 5

55 <210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Construcción sintética

ES 2 658 596 T3

<400> 24

Arg Ala Phe Gln Ala Ile Ser Asn Gln Leu Asn
1 5 10

5 <210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 25

Tyr Ile Ser Arg Phe His Thr
1 5

15 <210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

25 <400> 26

Arg Ala Phe Gln Ser Ile Ser Asn Gln Leu Asn
1 5 10

30 <210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 27

Tyr Ala Ser Arg Phe His Ser
1 5

40 <210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 28

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Ser Asn
1 5 10

50 <210> 29
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Construcción sintética

60

ES 2 658 596 T3

<400> 29

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu
1 5 10

5 <210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 30

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Leu Asn
1 5 10

15 <210> 31
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Construcción sintética

25 <400> 31

Ile Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val
1 5 10

30 <210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 32

Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr Asp Val Thr
1 5 10

40 <210> 33
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 33

50 Gly Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Val
1 5 10

55 <210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

60 <400> 34

ES 2 658 596 T3

		Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr	Asp	Val	Thr				
		1				5				10					
5		<210> 35 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial													
10		<220> <223> Construcción sintética													
		<400> 35													
		Gly	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ser	Val
		1				5				10					
15		<210> 36 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial													
20		<220> <223> Construcción sintética													
		<400> 36													
25		Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr	Asp	Ala	Thr				
		1				5					10				
30		<210> 37 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial													
		<220> <223> Construcción sintética													
35		<400> 37													
		Gly	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Val
		1				5				10					
40		<210> 38 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial													
45		<220> <223> Construcción sintética													
		<400> 38													
50		Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr	Asp	Val	Ser				
		1				5				10					
55		<210> 39 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial													
		<220> <223> Construcción sintética													
60		<400> 39													

ES 2 658 596 T3

	Ile	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ser	Val	
	1				5					10					
	<210> 40 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
5															
	<220> <223> Construcción sintética														
10															
	<400> 40														
		Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr	Asp	Ile	Ser				
		1				5					10				
15	<210> 41 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
20															
	<220> <223> Construcción sintética														
	<400> 41														
		Gln	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ser	Val
25		1				5					10				
	<210> 42 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
30															
	<220> <223> Construcción sintética														
35															
	<400> 42														
		Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr	Asp	Ala	Ser				
		1				5					10				
40	<210> 43 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
	<220> <223> Construcción sintética														
45															
	<400> 43														
		Gly	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ser	Val
50		1				5					10				
	<210> 44 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia artificial														
55															
	<220> <223> Construcción sintética														
	<400> 44														

ES 2 658 596 T3

		Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr	Asp	Ser	Thr				
		1				5					10				
5		<210> 45 <211> 14 <212> PRT <213> Secuencia artificial													
10		<220> <223> Construcción sintética <400> 45													
		Ser	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu
		1				5					10				
15		<210> 46 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial													
20		<220> <223> Construcción sintética <400> 46													
		Gly	Gly	Tyr	Trp	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	
25		1				5					10				
30		<210> 47 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial													
		<220> <223> Construcción sintética <400> 47													
35		<210> 48 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial													
		Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	
		1				5					10				
40		<220> <223> Construcción sintética <400> 48													
45		<210> 49 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial													
		Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	
50		1				5					10				
55		<220> <223> Construcción sintética <400> 49													
60		<210> 49 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial													

ES 2 658 596 T3

		Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
		1				5					10			
5		<210> 50 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
10		<220> <223> Construcción sintética <400> 50												
		Gln	Gln	Glu	Lys	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr				
		1				5								
15		<210> 51 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
20		<220> <223> Construcción sintética <400> 51												
		Gln	Gln	Glu	Ala	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr				
25		1				5								
30		<210> 52 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
35		<220> <223> Construcción sintética <400> 52												
		Gly	Gly	Tyr	Trp	Tyr	Ala	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
		1				5					10			
40		<210> 53 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
45		<220> <223> Construcción sintética <400> 53												
		Gln	Gln	Glu	Arg	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr				
		1				5								
50		<210> 54 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
55		<220> <223> Construcción sintética <400> 54												

ES 2 658 596 T3

		Gly	Gly	Tyr	Trp	Tyr	Ala	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
		1				5					10			
5		<210> 55 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
10		<220> <223> Construcción sintética <400> 55												
			Gln	Gln	Glu	His	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr			
			1				5							
15		<210> 56 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
20		<220> <223> Construcción sintética <400> 56												
		Gly	Gly	Tyr	Trp	Tyr	Ala	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
25		1				5					10			
30		<210> 57 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
		<220> <223> Construcción sintética												
35		<400> 57												
			Gln	Gln	Glu	Ser	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr			
			1				5							
40		<210> 58 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
45		<220> <223> Construcción sintética <400> 58												
		Gly	Gly	Tyr	Trp	Tyr	Ser	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
50		1				5					10			
55		<210> 59 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
		<220> <223> Construcción sintética												
60		<400> 59												

ES 2 658 596 T3

		Gln	Gln	Glu	Lys	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr				
		1				5								
5		<210> 60 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
10		<220> <223> Construcción sintética <400> 60												
		Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
		1				5					10			
15		<210> 61 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
20		<220> <223> Construcción sintética <400> 61												
25		Gln	Gln	Glu	Arg	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr				
		1				5								
30		<210> 62 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
		<220> <223> Construcción sintética												
35		<400> 62												
		Gly	Gly	Tyr	Trp	Tyr	Ala	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr
		1				5					10			
40		<210> 63 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
45		<220> <223> Construcción sintética <400> 63												
50		Gln	Gln	Glu	Arg	Thr	Leu	Pro	Tyr	Thr				
		1				5								
55		<210> 64 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial												
		<220> <223> Construcción sintética												
60		<400> 64												

ES 2 658 596 T3

Gly Gly Tyr Tyr Tyr Ala Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

5
<210> 65
<211> 1344
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 65

```
cagggtgcagc tgcaggagtc tggcccagga ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtt ctcacttata ggctatgata ttaactggat ccgacagcct 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggatt atctgggggtg atggaaccac agactataat 180
tcagctgtca aatcccgcgt caccatctca aaagacacct ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcgacacg gccgtgtatt actgtgagag aggaggttat 300
tggtacgcca ctagtacta ctttgactac tggggccagg gcaccctggg caccgtctcc 360
tcagcctcca ccaagggccc atctgtcttc ccactggccc catgctcccg cagcacctcc 420
gagagcacag ccgccttggg ctgcctgggc aaggactact tcccagaacc tgtgaccgtg 480
tcctggaact ctggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtcc 540
tcaggtctct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccat ccagcaactt cggcacccag 600
acctacacct gcaacgtaga tcacaagcca agcaacacca aggtcgacaa gaccgtggag 660
agaaagtgtt gtgtggagtg tccaccttgt ccagccctc cagtggccgg accatccgtg 720
ttcctgttcc ctccaaagcc aaaggacacc ctgatgatct ccagaacccc agaggtgacc 780
tgtgtgggtg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtgc agttcaactg gtatgtggac 840
ggagtggagg tgcacaacgc caagaccaag ccaagagagg agcagttcaa ctccaccttc 900
agagtgggtg gcgtgctgac cgtggtgcac caggactggc tgaacggaaa ggagtataag 960
tgtaagggtg ccaacaaggg actgccatcc agcatcgaga agaccatctc caagaccaag 1020
ggacagccaa gagagccaca ggtgtatacc ctgccacat ccagagagga gatgaccaag 1080
aaccaggtgt cctgacctg tctggtgaag ggattctatc catccgacat cgccgtggag 1140
tgggagtgcca acggacagcc agagaacaac tataagacca cccctccaat gctggactcc 1200
gacggatcct tcttctgtg ttccaagctg accgtggaca agtccagatg gcagcaggga 1260
aacgtgttct cttgttccgt gatgcacgag gccctgcaca accactatac ccagaagagc 1320
ctgtccctgt ctccaggaaa gtaa 1344
```

15
<210> 66
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20
<220>
<223> Construcción sintética
<400> 66

```
cagggtgcagc tgcaggagtc tggcccagga ctggtgaagc cttccgagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctgggtt ctcacttata ggctatgata ttaactggat ccgacagcct 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggatt atctgggggtg atggaaccac agactataat 180
tcagctgtca aatcccgcgt caccatctca aaagacacct ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcgacacg gccgtgtatt actgtgagag aggaggttat 300
tggtacgcca ctagtacta ctttgactac tggggccagg gcaccctggg caccgtctcc 360
tca 363
```

25
<210> 67
<211> 645
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 67

5 gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgcoct ctgtgggtga ccgcgtcacc 60
atcacctgcc gcgcattctca gtccattagc aataatctga actggtatca gcagaagcca 120
ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180
cgcttcagtg gcagtggtc tggtacagat ttcaccttca ccattagcag cctgcaacca 240
gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcataccc ttccatatac cttcggtcaa 300
ggcaccaagc tggagatcaa acgcactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctttcctcca 360
tctgatgagc agttgaaatc cggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
ccacgcgagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatccgg taactcccag 480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacmaa gtctacgcoct gcgaagtcac ccatcagggc 600
ctgagttctc cagtcacaaa gagcttcaac cgcggtgagt gctaa 645

<210> 68

<211> 324

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 68

gatatccaga tgacacagtc cccatcctcc ctgtctgcoct ctgtgggtga ccgcgtcacc 60
atcacctgcc gcgcattctca gtccattagc aataatctga actggtatca gcagaagcca 120
ggcaaagccc caaaactcct gatctactac acctcacgct tccactcagg tgtcccatca 180
cgcttcagtg gcagtggtc tggtacagat ttcaccttca ccattagcag cctgcaacca 240
gaagatattg ccacttatta ctgccaacag gagcataccc ttccatatac cttcggtcaa 300
ggcaccaagc tggagatcaa acgc 324

20 <210> 69

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 69

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

<210> 70

30 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Construcción sintética

ES 2 658 596 T3

<400> 70

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20          25          30
Asp Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35          40          45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50          55          60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95
Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115          120

```

5

<210> 71

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 71

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Gly Tyr
20          25          30
Asp Ile Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35          40          45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Thr Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50          55          60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95
Arg Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100          105          110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115          120

```

20

<210> 72

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<400> 72

ES 2 658 596 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Gly	Tyr
			20					25					30		
Asp	Leu	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Ile	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Val	Lys
	50					55					60				
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
65						70				75					80
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	
Arg	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
				100					105					110	
	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser							
			115					120							

<210> 73
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73

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

<210> 74
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 74

ES 2 658 596 T3

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

<210> 75
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 75

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

<210> 76
 <211> 1429
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 76

ES 2 658 596 T3

```

atggccaccg actccagaac ctccctggctg ctgacagtgt ccctgctgtg tctgctgtgg 60
ccacaggagg ccagcgtca ggtgcagctg caggagtctg gcccaggact ggtgaagcct 120
tccgagaccc tgtccctcac ctgcactgtc tctgggttct cacttatcgg ctatgatctt 180
aactggatcc gacagcctcc aggggaaggga ctggagtggg ttgggattat ctgggggtgat 240
ggaaccacag actataattc agctgtcaaa tcccgcgtca ccatctcaaa agacacctcc 300
aagaaccagt tctccctgaa gctgagctct gtgaccgccg cggacacggc cgtgtattac 360
tgtgagagag gaggttattg gtacgccact agctactact ttgactactg gggccagggc 420
accctgggtca ccgtctcctc agcctccacc aagggcccat ctgtcttccc actggcccca 480
tgctcccga gcacctccga gagcacagcc gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc 540
ccagaacctg tgaccgtgtc ctggaactct ggcgtctctga ccagcggcgt gcacaccttc 600
ccagctgtcc tgcagtcctc aggtctctac tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccatcc 660
agcaacttcg gcaaccagac ctacacctgc aacgtagatc acaagccaag caacaccaag 720
gtcgacaaga ccgtggagag aaagtgttgt gtggagtgtc caccttgtcc agcccctcca 780
gtggccggac catccgtgtt cctgttccct ccaaagccaa aggacaccct gatgatctcc 840
agaaccccag aggtgacctg tgtggtgggtg gacgtgtccc acgaggaccc agagggtgcag 900
ttcaactggt atgtggacgg agtggagggtg cacaacgcc aagaccaagcc aagagaggag 960
cagttcaact ccaccttcag agtgggtgagc gtgctgaccg tgggtgcacca ggactggctg 1020
aacggaaagg agtataagtg taagggtgtcc aacaagggac tgccatccag catcgagaag 1080
accatctcca agaccaaggg acagccaaga gagccacagg tgtataccct gccaccatcc 1140
agagaggaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tgggtgaaggg attctatcca 1200
tccgacatcg ccgtggagtg ggagtccaac ggacagccag agaacaacta taagaccacc 1260
cctccaatgc tggactccga cggatccttc ttcctgtatt ccaagctgac cgtggacaag 1320
tccagatggc agcagggaaa cgtgttctct tgttccgtga tgcacgaggc cctgcacaac 1380
cactataccc agaagagcct gtccctgtct ccaggaaagt aattctaga 1429

```

<210> 77
 <211> 729
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 646
 <223> m = A o C

<400> 77

```

atggccaccg actccagaac ctccctggctg ctgacagtgt ccctgctgtg tctgctgtgg 60
ccacaggagg ccagcgtga tatccagatg acacagtccc catcctccct gtctgcctct 120
gtgggtgacc gcgtcaccat cacctgccgc gcatctcagt ccattagcaa taatctgaac 180
tggtatcagc agaagccagg caaagcccca aaactcctga tctactacac ctcacgcttc 240
cactcaggtg tcccatcacg cttcagtggtc agtggctctg gtacagattt caccttcacc 300
attagcagcc tgcaaccaga agatattgcc acttattact gccaacagga gcataccctt 360
ccatatacct tcggtcaagg caccaagctg gagatcaaac gcactgtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct ttccctccatc tgatgagcag ttgaaatccg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc acgcgaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgccctc 540
caatccggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgaccct gagcaaagca gactacgaga aacacmaagt ctacgcctgc 660
gaagtcaccc atcagggcct gagttctcca gtcacaaaga gtttcaaccg cggtagtgatgc 720
taattctag 729

```

REIVINDICACIONES

1. Una composición líquida de anticuerpo anti-NGF que comprende:
 - un anticuerpo,
 - un agente de tonicidad,
 - un tampón,
 - un agente quelante,
 - un tensioactivo,
 - en la que el pH de dicha composición es de 5,8 a 6,8,
 - en la que el tensioactivo es polisorbato 20,
 - en la que el tampón es histidina,
 - en la que el agente de tonicidad es trehalosa y
 - en la que el anticuerpo comprende una secuencia variable de cadena pesada de SEQ ID N.º: 1 y una secuencia variable de cadena ligera de SEQ ID N.º: 2.
2. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el agente de tonicidad es trehalosa dihidrato.
3. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la concentración de trehalosa dihidrato es de 1 mg/ml a 100 mg/ml.
4. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la concentración de polisorbato 20 es de 0,01 a 0,15 mg/ml.
5. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la concentración de tampón de histidina es de 1,0 a 0,15 mM.
6. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el agente quelante es EDTA.
7. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la concentración del EDTA es de 0,01 a 0,1 mg/ml.
8. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la concentración de anticuerpo es inferior a o igual a 50 mg/ml.
9. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende además un agente antioxidante y / o un agente conservante.
10. La composición líquida anti-NGF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende:
 - 0,5 mg/ml a 50 mg/ml del anticuerpo,
 - 1,0 mM a 15 mM de tampón histidina,
 - 1 mg/ml a 100 mg/ml de trehalosa dihidrato,
 - 0,01 a 0,15 mg/ml de polisorbato 20,
 - 0,01 a 0,1 mg/ml de EDTA,
- en la que el pH de dicha composición es de 5,8 a 6,8.
11. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.
12. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el anticuerpo es un anticuerpo IgG2.
13. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el anticuerpo se une a NGF humano con una K_D menor de o igual a 2 nM.
14. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el anticuerpo comprende una secuencia variable de cadena pesada de SEQ ID N.º: 16 y una secuencia variable de cadena ligera de SEQ ID N.º: 17.
15. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que la composición no está liofilizada y no se ha sometido a liofilización.
16. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que la composición es resistente a la agregación del anticuerpo después de múltiples ciclos de congelación descongelación.
17. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que la composición puede almacenarse durante un periodo de al menos 26 semanas a una temperatura de 40°C, y en la que existe:

- (a) un aumento de menos del 10% en la agregación del anticuerpo de la composición,
- (b) un aumento de menos del 10% en la oxidación del anticuerpo de la composición o
- (c) una disminución de menos del 10% en la actividad del anticuerpo de la composición.

- 5 18. La composición líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que la composición puede almacenarse durante un periodo de al menos 26 semanas a una temperatura de 40°C, y en la que existe una disminución de menos de aproximadamente el 10% en la actividad del anticuerpo de la composición.
- 19. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para su uso en el tratamiento del dolor en un mamífero.
- 10 20. La composición líquida para su uso de acuerdo con la reivindicación 19, en la que el patrón de administración de la composición comprende la administración de una dosis de la composición una vez cada ocho semanas.
- 21. La composición líquida para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en la que el volumen de la dosis es inferior o igual a 2,5 ml.
- 22. La composición líquida para su uso de acuerdo con la reivindicación 20 o la reivindicación 21 en la que la dosis contiene menos de o es igual a 50 mg de anticuerpo.
- 15 23. La composición líquida para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 en la que la administración de la dosis es intravenosa o subcutánea.

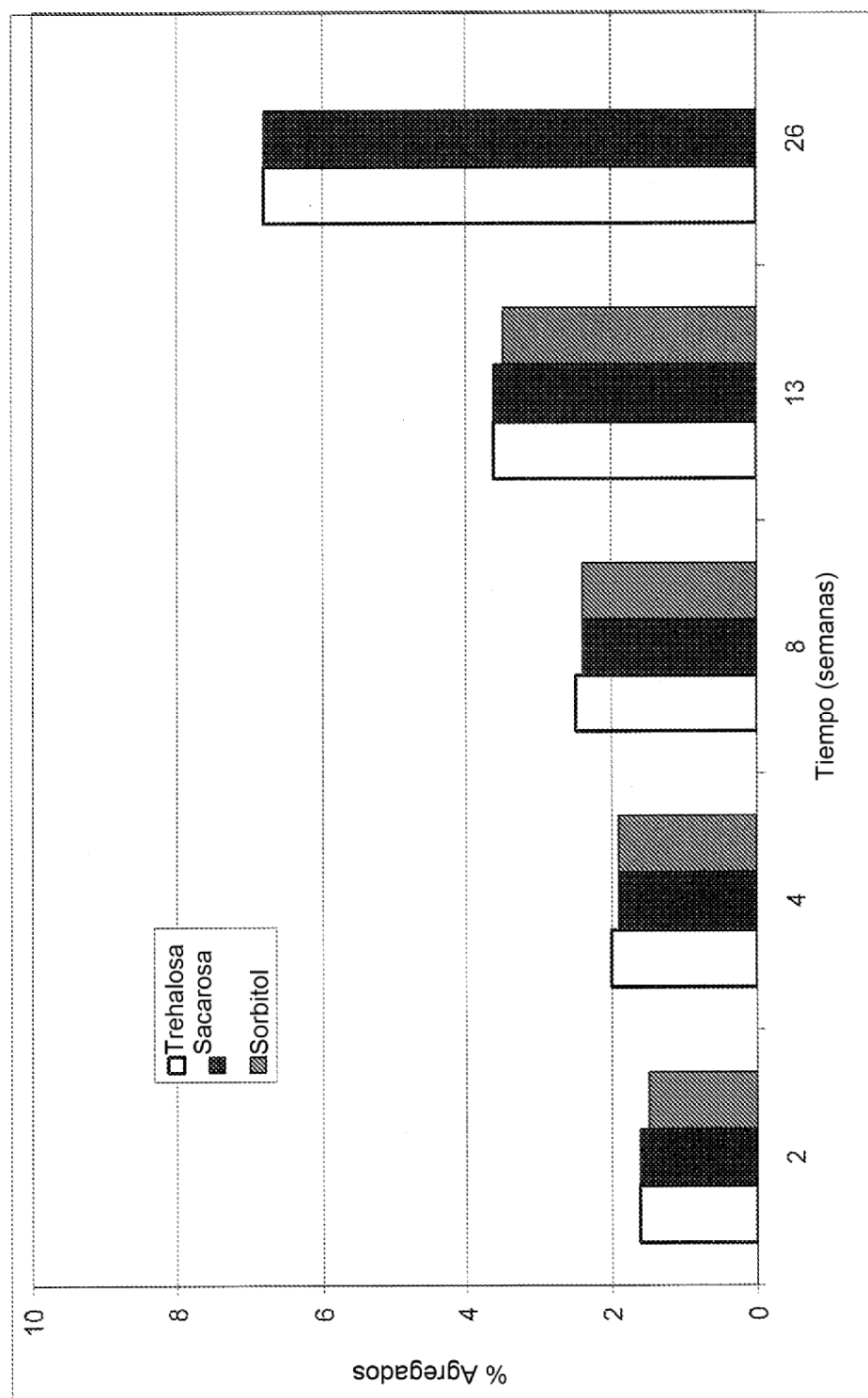


Figura I

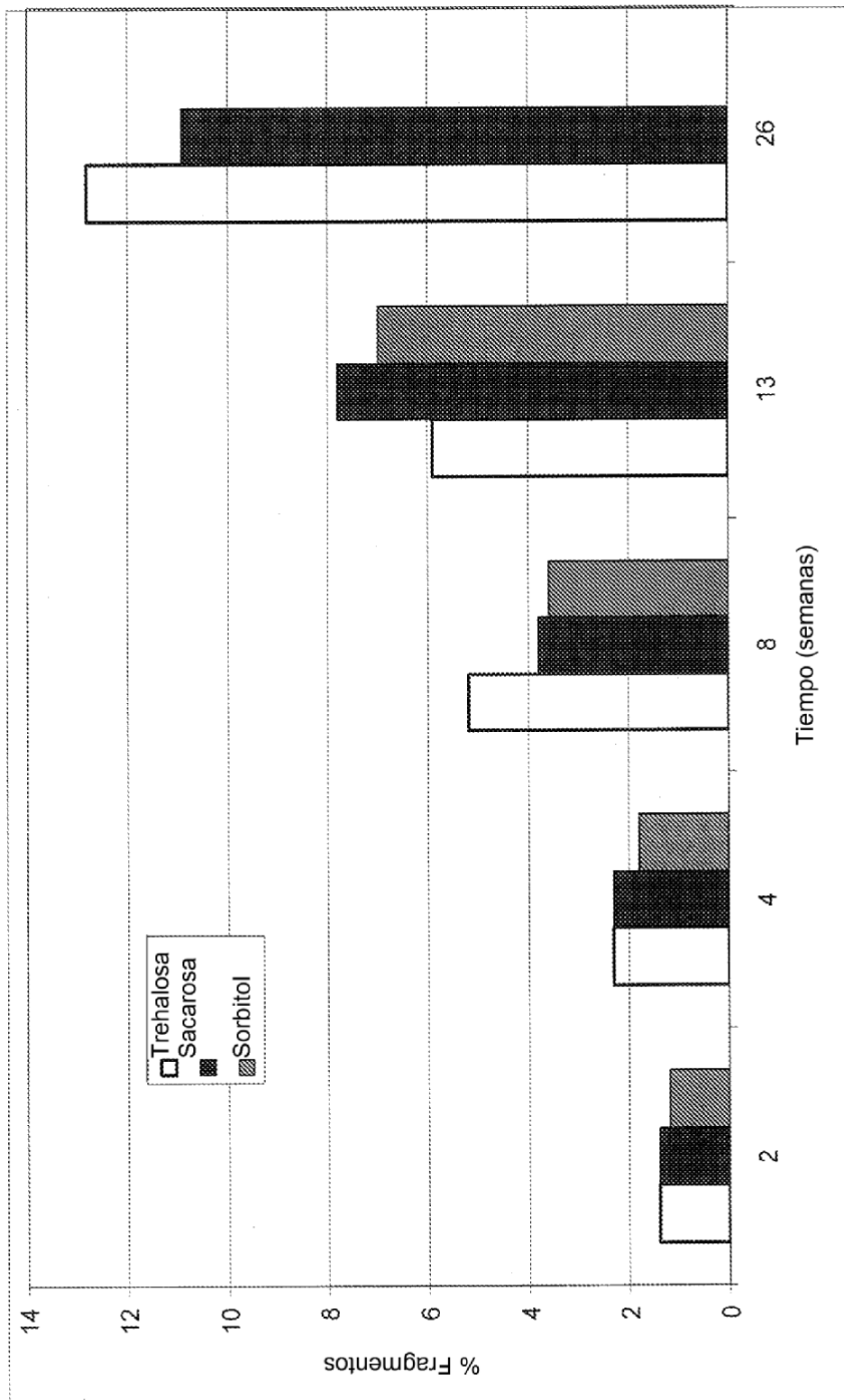


Figura 2

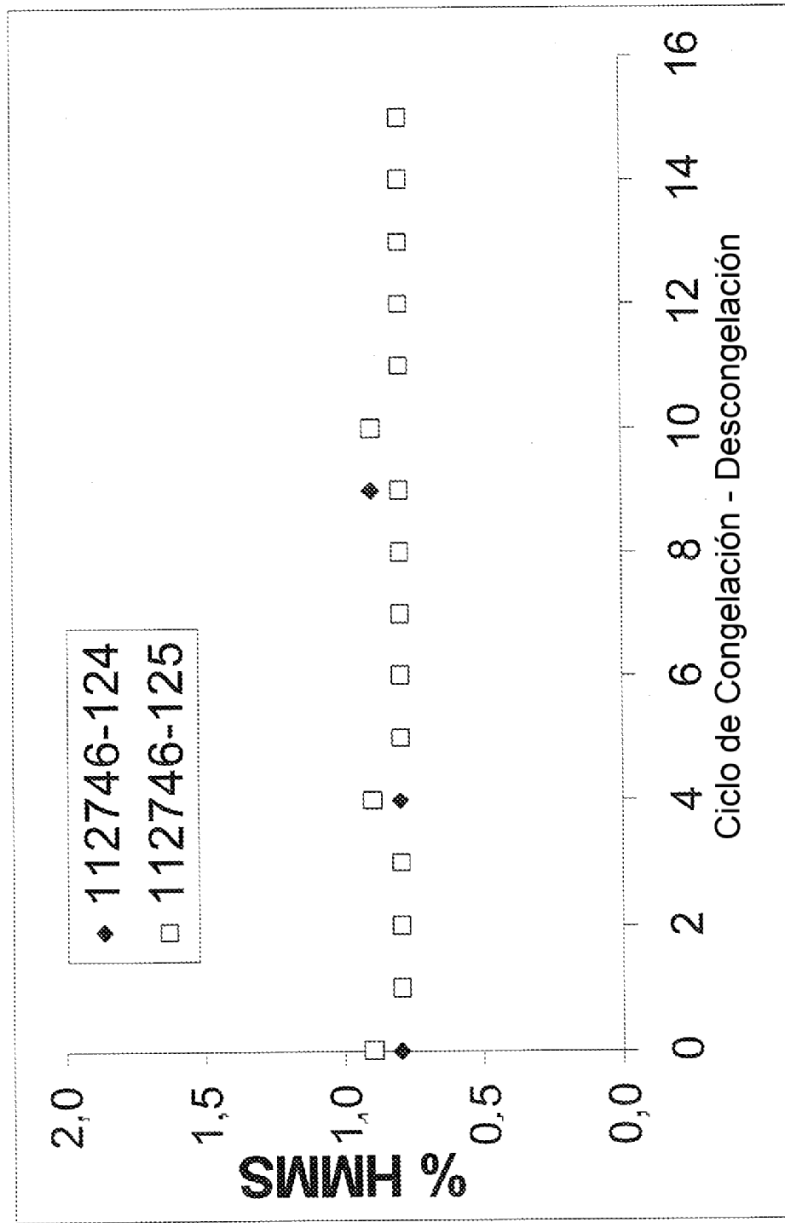


Figura 3

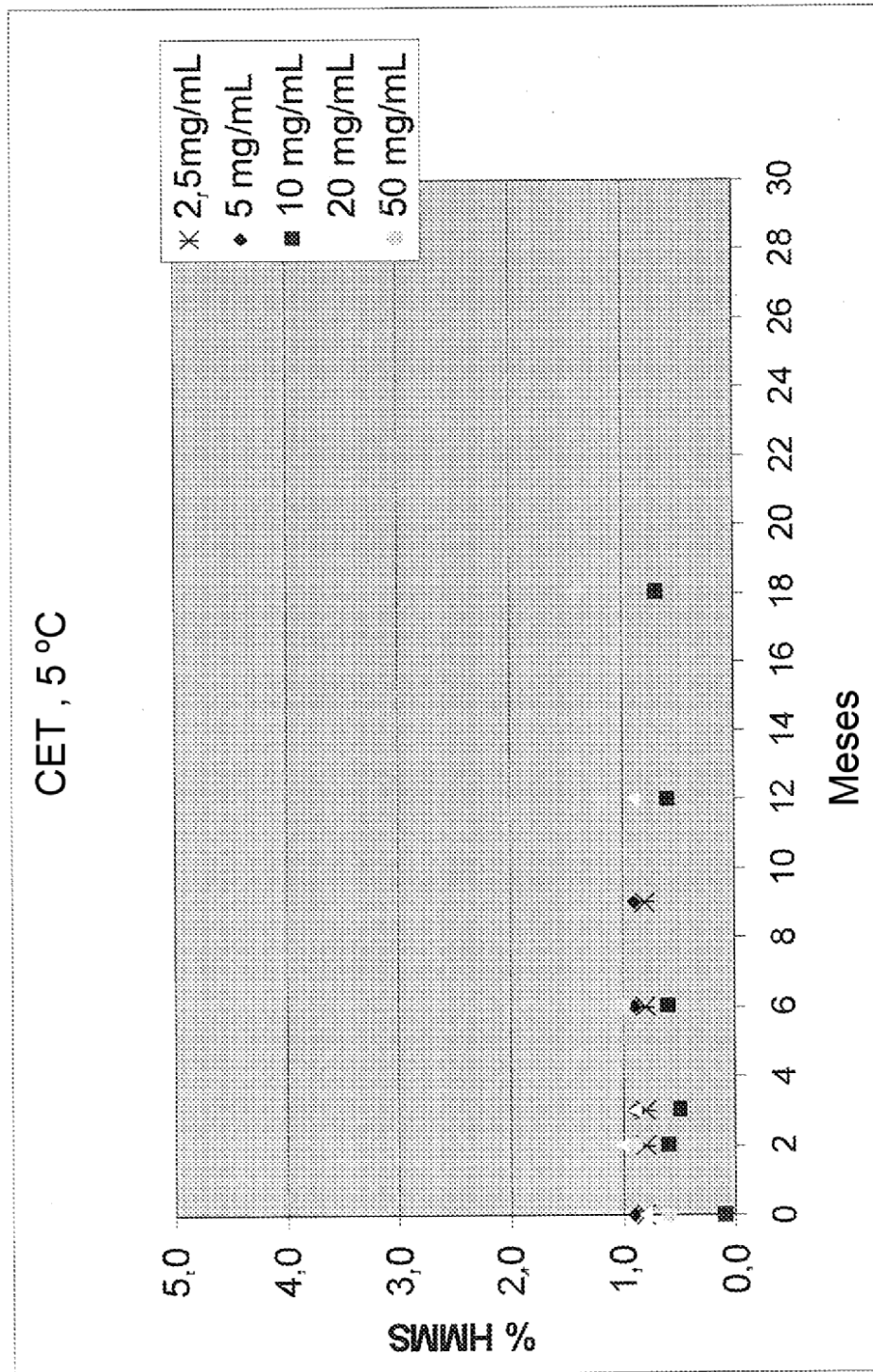


Figura 4

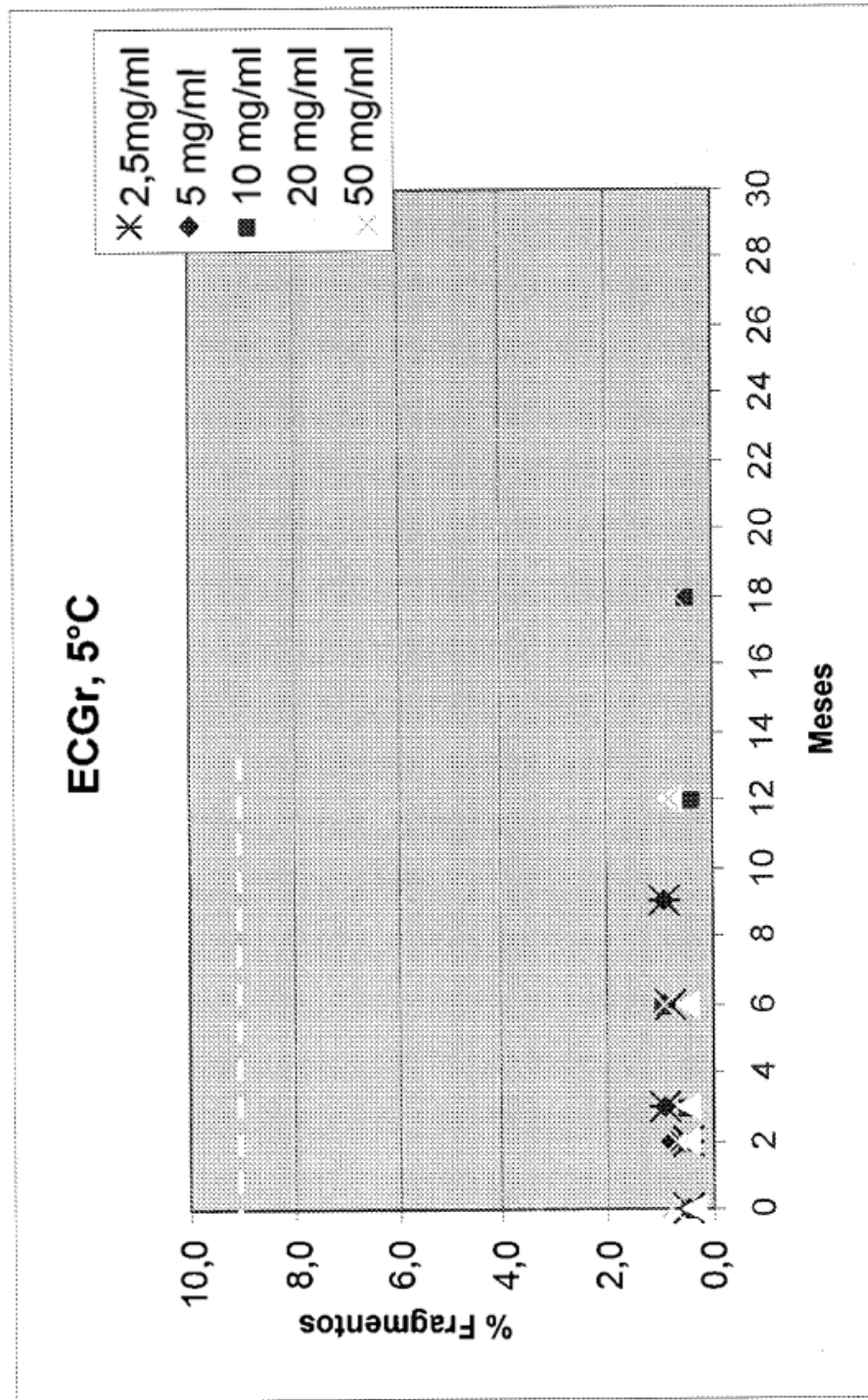


Figura 5

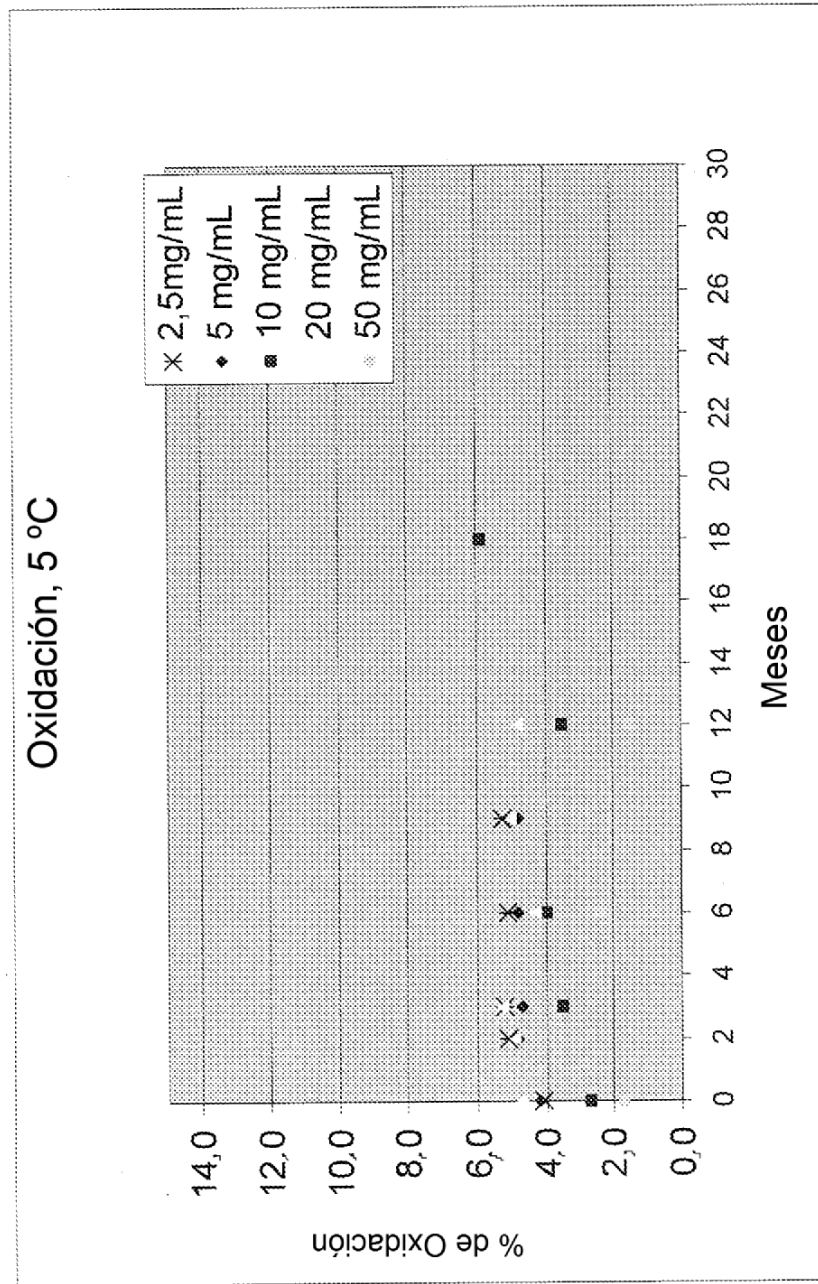


Figura 6