

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 821**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2008 PCT/US2008/069125**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2009 WO09009407**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2008 E 08781323 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2170388**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpos anti-CD20**

30 Prioridad:

06.07.2007 US 948220 P

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

03.05.2017

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BRISBANE, CHARLENE, E.;
KETKAR, AMOL, SHARAD y
LASHMAR, ULLA, TOVE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 610 821 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

Formulaciones de anticuerpos anti-CD20

Campo de la invención

Esta invención se refiere a formulaciones de anticuerpos estables a la temperatura y la cizalladura.

5 Antecedentes de la invención

Las proteínas son más grandes y más complejas que los fármacos orgánicos e inorgánicos tradicionales (es decir, tienen múltiples grupos funcionales además de estructuras tridimensionales complejas) y la formulación de dichas proteínas tiene problemas especiales. Para que una proteína siga siendo biológicamente activa, una formulación debe conservar la integridad conformacional intacta de al menos una secuencia central de los aminoácidos de la proteína, mientras que al mismo tiempo debe proteger los múltiples grupos funcionales de la proteína frente a la degradación. Las rutas de degradación para las proteínas pueden implicar inestabilidad química (es decir, cualquier proceso que implique la modificación de la proteína por formación o escisión de enlace, que da como resultado una nueva entidad química) o inestabilidad física (es decir, cambios en la estructura de orden superior de la proteína). La inestabilidad química puede resultar de la desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, beta-eliminación o intercambio de disulfuro. La inestabilidad física puede resultar de la desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción, por ejemplo. Las tres rutas de degradación de proteínas más comunes son la agregación de proteínas, desamidación y oxidación. Cleland *et al. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993).

La molécula CD20 (también llamada antígeno de diferenciación restringido a los linfocitos B o Bp35) es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD localizada en prelinfocitos B y linfocitos B maduros (Valentine *et al. (1989) J. Biol. Chem.* 264(19):11282-11287; y Einfield *et al. (1988) EMBO J.* 7(3):711-717). CD20 se encuentra en la superficie de más de 90% de las células B de la sangre periférica u órganos linfoides y se expresa durante el desarrollo temprano de las precélulas B y permanece hasta la diferenciación de las células plasmáticas. CD20 está presente tanto en células B normales como en células B malignas. En particular, CD20 se expresa en más de 90% de los linfomas no Hodgkin de células B (LNH) (Anderson *et al. (1984) Blood* 63(6):1424-1433), pero no se encuentra en células madre hematopoyéticas, procélulas B, células plasmáticas normales, u otros tejidos normales (Tedder *et al. (1985) J. Immunol.* 135(2):973-979).

La región carboxilo terminal de 85 aminoácidos de la proteína CD20 está situada dentro del citoplasma. La longitud de esta región contrasta con la de otras estructuras de superficie específicas de células B tales como las cadenas pesadas de IgM, IgD e IgG o cadenas alfa o beta de los antígenos de histocompatibilidad de clase II, que tienen regiones intracitoplasmáticas relativamente cortas de 3, 3, 28, 15 y 16 aminoácidos, respectivamente (Komaromy *et al. (1983) NAR* 11:6775-6785). De los últimos 61 aminoácidos carboxilo terminales, 21 son restos ácidos, mientras que sólo 2 son básicos, lo que indica que esta región tiene una fuerte carga negativa neta. El nº de acceso a GenBank es NP.sub.--690605.

Se cree que CD20 puede estar implicada en la regulación de una(s) etapa(s) temprana(s) en el proceso de activación y diferenciación de células B (Tedder *et al. (1986) Eur. J. Immunol.* 16:881-887) y podría funcionar como un canal de iones calcio (Tedder *et al. (1990) J. Cell. Biochem.* 14D:195).

A pesar de la incertidumbre sobre la función real de CD20 en la promoción de la proliferación y/o diferenciación de células B, proporciona un objetivo importante para la terapia mediada por anticuerpos para controlar o matar células B implicadas en cánceres y trastornos autoinmunes. En particular, la expresión de CD20 en células tumorales, p. ej., LNH, hace que sea un objetivo importante para la terapia mediada por anticuerpos para dirigir específicamente agentes terapéuticos contra las células neoplásicas positivas para CD20. El documento US 2006/0246004 A1 da a conocer una formulación líquida de múltiples dosis que comprende el anticuerpo hu2H7 a 40 mg/ml, un anticuerpo humanizado que se une a CD20 humana, acetato 2,5 mM, trehalosa 150 mM, alcohol bencílico al 0,9%, polisorbato 20 al 0,02% a pH de 5,0 que tiene una semivida mínima de dos años de almacenamiento a 2-8°C y que puede usarse en el tratamiento de tumores malignos de células B y enfermedades autoinmunes.

HuMax-CD20™ (ofatumumab), descrito como anticuerpo 2F2 en el documento WO2004/035607, es un anticuerpo de alta afinidad IgG1,κ totalmente humano dirigido a la molécula CD20 en la membrana celular de células B. HuMax-CD20™ está en desarrollo clínico para el tratamiento del linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia linfocítica crónica (LLA) y artritis reumatoide (AR). Véase también, Teeling *et al., Blood*, 104, pág. 1793 (2004); y Teeling *et al., J. Immunology*, 177, págs. 362-371 (2007).

Existe la necesidad de formular una formulación farmacéutica estable a la temperatura y la cizalladura que comprenda un anticuerpo que sea adecuado para uso terapéutico. En una realización, el anticuerpo puede ser un

anticuerpo monoclonal. En otra realización el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20, incluyendo pero no limitado a ofatumumab, rituximab, tositumomab, ocrelizumab (2H7.v16), 11B8 o 7D8 (descrito en el documento WO2004/035607), un anticuerpo anti-CD20 descrito en el documento WO 2005/103081 tal como C6, un anticuerpo anti-CD descrito en el documento WO2003/68821 tal como IMMU-106 (de Immunomedics), un anticuerpo anti-CD20 descrito en el documento WO2004/103404 tal como AME-133 (de Applied Molecular Evolution/Lilly) y un anticuerpo anti-CD20 descrito en el documento US 2003/0118592 tal como TRU-015 (de Trubion Pharmaceuticals Inc).

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a una formulación acuosa de anticuerpo estable a la temperatura y la cizalladura.

En un aspecto, la invención se refiere a una formulación de ofatumumab que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ofatumumab, en la que la formulación comprende además acetato de sodio de 10 a 100 mM, cloruro de sodio de 25 a 100 mM, base libre de arginina a del 0,5 al 5%, EDTA de 0,02 a 0,2 mM, polisorbato 80 a del 0,01 al 0,2% y ajustada a pH de 5,0 a 7,0.

En una realización, la invención se refiere a una formulación de ofatumumab que comprende un ofatumumab en el intervalo de concentración de 20-300 mg/ml, en el que la formulación comprende además acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 51 mM, base libre de arginina al 1%, EDTA 0,05 mM, polisorbato 80 al 0,02%, y ajustada a pH 5,5.

En otra realización más, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-CD20, en la que la formulación es estable durante al menos 2 años. En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-CD20, en la que la formulación es estable a temperaturas de hasta al menos 55°C. En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-CD20, en la que la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 5°C durante al menos 2 años. En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-CD20, en la que la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 25°C durante al menos 3 meses. En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-CD20, en la que la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 40°C durante al menos 1 mes. En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-CD20, en la que la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 55°C durante al menos 1 día. En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-CD20 en la que la formulación es estable en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 5 a 25°C, 5 a 35°C, 5 a 45°C, 10 a 25°C, 10 a 35°C, 10 a 45°C, 10 a 55°C, 20 a 35°C, 20 a 45°C o 20 a 55°C durante al menos 1 día, con agitación.

En otra realización, la invención se refiere a una formulación de ofatumumab en la que el anticuerpo está presente en una cantidad de aproximadamente 20-300 mg/ml, 50-300 mg/ml, 100-300 mg/ml, 150-300 mg/ml, 200-300 mg/ml o 250-300 mg/ml.

En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-CD20 en la que el acetato de sodio está presente en una cantidad de aproximadamente 50 mM, 40 mM, 45 mM, 55 mM o 60 mM. En otras realizaciones, el acetato de sodio puede estar presente en una cantidad de 10 a 100 mM, 20 a 100 mM, 30 a 100 mM, 40 a 100 mM, 50 a 100 mM, 60 a 100 mM, 70 a 100 mM, 25 a 80 mM o 30 a 70 mM.

En otra realización más, la invención se refiere a una formulación de ofatumumab en la que el ácido acético está presente (ácido acético aproximadamente 100 mM) para ajustar la formulación a pH aproximadamente 5,5. En otras realizaciones, el pH puede ajustarse a pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 ó 7,0. En otras realizaciones más de la invención, se usa NaOH o HCl para ajustar el pH a 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 ó 7,0.

En otra realización más, la invención se refiere a una formulación de ofatumumab en la que el cloruro de sodio está presente en una cantidad de aproximadamente 51 mM, 45 mM, 46 mM, 47 mM, 48 mM, 49 mM, 50 mM, 52 mM, 53 mM, 54 mM, 55 mM. En otras realizaciones, el cloruro de sodio puede estar presente en una cantidad de 25 a 100 mM, 35 a 90 mM, 45 a 80 mM, 25 a 70 mM o 45 a 70 mM.

En otra realización, la invención se refiere a una formulación de ofatumumab en la que la base libre de arginina está presente en una cantidad de aproximadamente el 1%, el 0,7%, el 1,3% o el 2,0%. En otras realizaciones, la base libre de arginina puede estar entre el 0,5 y el 5,0%, del 0,5 al 2,0%, del 0,5 al 2,5%, del 0,5 al 3,0%, del 0,5 al 3,5%, del 0,5 al 4,0% o del 0,5 al 4,5%.

En otra realización, la invención se refiere a una formulación de ofatumumab en la que el EDTA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mM, 0,03 mM, 0,04 mM o 0,06 mM. En otras realizaciones, el EDTA puede estar presente en una cantidad de 0,02 mM - 0,2 mM, 0,02 mM - 0,1 mM, 0,02 mM - 0,15 mM, 0,04 mM - 0,1 mM, 0,03 mM - 0,15 mM o 0,03 mM - 0,2 mM.

En otra realización, la invención se refiere a una formulación de ofatumumab en la que el polisorbato 80 está

presente en una cantidad de aproximadamente el 0,02%, el 0,015% o el 0,025%. En otras realizaciones, el polisorbato 80 puede estar presente en una cantidad del 0,01 - 0,2%, 0,01 - 0,15%, 0,02 - 0,2%, 0,02 - 0,15%, 0,01 - 0,25% o 0,01 - 0,05%.

5 Se describe un método de tratamiento de una enfermedad que implica células que expresan CD20 por administración a un mamífero de una formulación de ofatumumab de la presente invención que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ofatumumab, en la que la formulación comprende además acetato de sodio de 10 a 100 mM, cloruro de sodio de 25 a 100 mM, base libre de arginina a del 0,5 al 5%, EDTA de 0,02 a 0,2 mM, polisorbato 80 a del 0,01 al 0,2% y ajustada a pH de 5,0 a 7,0. Las "enfermedades que implican células que expresan CD20" a modo de ejemplo que pueden tratarse (p.ej., mejorarse) o prevenirse incluyen, pero no se limitan a enfermedades tumorigénicas y enfermedades inmunes, p. ej., enfermedades autoinmunes. Los ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen linfoma de células B, p. ej. LNH, leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras y neoplasmas de células B maduras, tal como leucemia linfocítica crónica de células B (LLC)/linfoma linfocítico pequeño (LLP), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células del manto (LCM), linfoma folicular (LF), incluyendo LF de grado bajo, grado intermedio y grado alto, linfoma del centro del folículo cutáneo, linfoma de células B de zona marginal (tipo MALT, tipo nodal y esplénico), tricoleucemia, linfoma de células B grandes y difusas, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo postrasplante, macroglobulinemia de Waldenstrom y linfoma anaplásico de células grandes (LACG). Los ejemplos de trastornos inmunes en los que están implicados células B que expresan CD20 que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis, esclerodermia sistémica y esclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de dificultad respiratoria, meningitis, encefalitis, uveítis, glomerulonefritis, eccema, asma, aterosclerosis, deficiencia de adhesión leucocitaria, esclerosis múltiple, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjogren, diabetes de inicio juvenil, enfermedad de Reiter, enfermedad de Behcet, nefritis por inmunocomplejo, nefropatía IgA, polineuropatías IgM, trombocitopenias inmunomediadas, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, anemia hemolítica, miastenia grave, nefritis por lupus, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide (AR), dermatitis atópica, pénfigo, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegener, síndrome de Omenn, insuficiencia renal crónica, mononucleosis infecciosa aguda, VIH y enfermedades asociadas con el virus del herpes. Otros ejemplos son síndrome de dificultad respiratoria grave y coriorretinitis. Otros ejemplos más son enfermedades y trastornos causados por infección de células B con virus, tales como el virus de Epstein-Barr (VEB). Otro ejemplo más es la EPOC.

35 Se describe un método de tratamiento de una enfermedad que implica células que expresan CD20 por administración a un mamífero de una formulación de ofatumumab de la presente invención que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de ofatumumab, en la que la formulación comprende además acetato de sodio de 10 a 100 mM, cloruro de sodio de 25 a 100 mM, base libre de arginina a del 0,5 al 5%, EDTA de 0,02 a 0,2 mM, polisorbato 80 a del 0,01 al 0,2% y ajustada a pH de 5,0 a 7,0, y en la que la formulación de anticuerpo estable se administra por vía oral, parenteral, intranasal, vaginal, rectal, lingual, sublingual, bucal, transdérmica, intravenosa o subcutánea a un mamífero.

40 Se describe un método de tratamiento de una enfermedad que implica células que expresan CD20 por administración a un mamífero de una formulación de ofatumumab de la presente invención que comprende ofatumumab en el intervalo de concentración de 20-300 mg/ml, en la que la formulación comprende además acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 51 mM, base libre de arginina al 1%, EDTA 0,05 mM, polisorbato 80 al 0,02%, y ajustada a pH 5,5.

Debe entenderse que tanto la descripción del sumario anterior como la siguiente descripción detallada son ilustrativas y explicativas, y no se pretende que proporcionen más explicación de la invención tal como se reivindica.

45 Los dibujos que acompañan se incluyen para proporcionar una mejor comprensión de la invención, y se incorporan en y constituyen una parte de el presente documento descriptiva, ilustran varias realizaciones de la invención, y junto con la descripción sirven para explicar los principios de la invención.

Breve descripción de las figuras

50 La figura 1 ilustra la formulación convencional (RefMat) de anticuerpo anti-CD20 a 20 mg/ml (citrateo 30 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5) por duplicado.

La figura 2 ilustra una realización de la formulación de la invención (de plataforma) del anticuerpo anti-CD20 a 20 mg/ml (acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio (51 mM), base libre de arginina al 1%, EDTA 0,05 mM, polisorbato 80 al 0,02% y ajustada a pH 5,5 con HCl) por duplicado.

55 La figura 3 ilustra gráficamente una comparación de la estabilidad térmica del anticuerpo anti-CD20 en una realización de formulación de la invención (PlatForm) y tampones de formulación convencionales (RefMat) por DSC.

Termodinámicamente, las dos formulaciones son similares tal como puede observarse por sus perfiles de DSC, puesto que el cambio en la T_m aparente es menor de 0,5°C entre las formulaciones.

Descripción detallada de la invención

5 Una realización de la presente invención se refiere a formulaciones de anticuerpo estables a la temperatura y la cizalladura.

En una realización, la invención proporciona una estabilidad inesperada observada para una formulación en condiciones simultáneas de estrés de temperatura elevada y agitación a 55°C.

10 Otra realización de la invención es una formulación más estable en comparación con una formulación convencional (tal como citrato 30 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5). La formulación de la presente invención mostraba menor precipitación (permanecía transparente) cuando se sometía a condiciones de estrés, mientras que la formulación convencional se agregaba. Este resultado era impredecible porque termodinámicamente las dos formulaciones son similares tal como se observa por sus perfiles de DSC (calorimetría diferencial de barrido).

En la descripción de la presente invención, algunos términos se usan tal como se definen a continuación.

15 La expresión “formulación de proteína” o “formulación de anticuerpo” se refiere a preparaciones que están en una forma tal que permite que la actividad biológica de los principios activos sea inequívocamente eficaz, y que no contienen componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a los que se administraría la formulación.

Excipientes “farmacéuticamente aceptables” (vehículos, aditivos) son los que pueden administrarse razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis eficaz del principio activo empleado. Por ejemplo, la concentración del excipiente también es relevante para la aceptabilidad para inyección.

20 Una formulación “estable” es una en la que la proteína en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o química y/o actividad biológica tras el almacenamiento. En la técnica están disponibles diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de la proteína y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs (1991) y Jones, A., *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado.
25 Preferiblemente, la formulación es estable a temperatura ambiental o a 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a 2-8°C durante al menos 1 a 2 años. Además, es deseable que la formulación sea estable después de congelación (p. ej. a -70°C) y descongelación del producto.

30 Una proteína “retiene su estabilidad física” en una formulación biofarmacéutica si muestra pocos o ningún cambio en la agregación, precipitación y/o desnaturalización cuando se observa por examen visual del color y/o la transparencia, o cuando se mide por difracción de luz UV (mide agregados visibles) o por cromatografía de exclusión molecular (SEC). SEC mide agregados solubles que no son necesariamente un precursor para agregados visibles.

35 Una proteína “retiene su estabilidad química” en una formulación biofarmacéutica, si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que la proteína retiene su actividad biológica tal como se define a continuación. Las especies químicamente degradadas pueden ser biológicamente activas y químicamente inestables. La estabilidad química puede evaluarse detectando y cuantificando formas de la proteína químicamente alteradas. La alteración química puede implicar modificación de tamaño (p. ej., corte) que puede evaluarse usando SEC, SDS-PAGE y/o espectrometría de masas con ionización por desorción láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI/TOF EM), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen alteración de carga (p. ej., que se produce como resultado de desamidación) que puede evaluarse por cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo.
40

45 Un anticuerpo “retiene su actividad biológica” en una formulación farmacéutica, si el cambio en la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado está dentro de aproximadamente el 10% (dentro del error del ensayo) de la actividad biológica que presentaba en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica, tal como se determina en un ensayo de unión a antígeno, por ejemplo. A continuación se elaboran otros ensayos de “actividad biológica” para anticuerpos en el presente documento.

50 El término “isotónico” significa que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. En una realización, las formulaciones isotónicas de la invención en general tendrán una presión osmótica en el intervalo de 250 a 350 mOsm. En otras realizaciones, las formulaciones isotónicas de la invención tendrán una presión osmótica de desde aproximadamente 350 hasta 450 mOsm. En otra realización más, las formulaciones isotónicas de la invención tendrán una presión osmótica por encima de 450 mOsm. La isotonicidad puede medirse usando un osmómetro de tipo congelación o presión de vapor, por ejemplo.

Tal como se usa en el presente documento, "tampón" se refiere a una disolución tamponada que resiste cambios en el pH por acción de sus componentes de conjugado de ácido-base. En una realización, el tampón de esta invención tiene un pH en el intervalo de desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 6,0; en otra realización, desde aproximadamente 4,8 hasta aproximadamente 5,8; y en una realización más, un pH de aproximadamente 5,5. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen acetato (p. ej. acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato y otros tampones de ácidos orgánicos. Cuando se desea una formación estable a la congelación-descongelación, preferiblemente el tampón no es fosfato.

En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o el tratamiento de un trastorno para el tratamiento del cual el anticuerpo es eficaz. Un "trastorno" es cualquier estado que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen los estados patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. En una realización preferida "trastorno" es una enfermedad que implica células que expresan CD20.

Un "conservante" es un compuesto que puede incluirse en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en la misma, facilitando así la producción de una formulación de múltiples usos, por ejemplo. Los ejemplos de posibles conservantes incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. El conservante más preferido en el presente documento es alcohol bencílico.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, en general la región de unión a antígeno o variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones que se producen de manera natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpo (policlonal) convencionales que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo tal como se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe considerarse que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la patente estadounidense nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando la técnica descrita en Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-626 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (p. ej. murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la FR de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen para refinar más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno y normalmente dos dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "sFv" comprenden el dominio V_H y V_L del anticuerpo, en los

que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. En general, el polipéptido Fv comprende además un ligador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el SFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, N.Y., págs. 269-315 (1994).

5 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H y V_L). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo en el documento EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993).

15 La expresión "anticuerpos lineales" cuando se usa a lo largo de esta solicitud se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata *et al. Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995). Brevemente, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H--C_H--V_{H1}--C_{H1}) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

20 El anticuerpo que se formula preferiblemente es esencialmente puro y de manera deseable esencialmente homogéneo (es decir, libre de proteínas contaminantes, etc.). Anticuerpo "esencialmente puro" significa una composición que comprende al menos aproximadamente el 90% en peso del anticuerpo, basado en el peso total de la composición, preferiblemente al menos aproximadamente el 95% en peso. Anticuerpo "esencialmente homogéneo" significa una composición que comprende al menos aproximadamente el 99% en peso del anticuerpo, basado en el peso total de la composición.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que va a prevenirse el trastorno.

25 "Mamífero" para los fines del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo, pero no limitado a seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos y vacas.

"Condición de estrés" se refiere a un entorno que es química y físicamente desfavorable para una proteína y puede hacer inaceptable la estabilidad de la proteína (p. ej., estrés térmico, de cizalladura, químico).

30 La cromatografía de exclusión molecular es un método cromatográfico en el que las partículas se separan basándose en su tamaño o volumen hidrodinámico.

La dispersión de luz dinámica es un método que mide la dependencia con el tiempo de la luz dispersada por la proteína. Normalmente, esta dependencia del tiempo se procesa para dar el radio hidrodinámico de una molécula.

35 "DSC" se refiere a calorímetro diferencial de barrido: Parámetros de adquisición de DSC: pueden ser, pero no se limitan a proteína 1 mg/ml, barrido de 5 a 80°C con una velocidad de barrido de 70°C por hora y 15 minutos de espera entre barridos. Se puede adquirirse en primer lugar un barrido de tampón-tampón y después restarlo de los datos sin procesar. Los datos pueden corregirse para el tampón y normalizarse para la concentración de proteína y después representarse gráficamente. La agregación puede prevenir la corrección inicial.

Los siguientes ejemplos son una ilustración adicional de la invención. No se pretende que los ejemplos limiten el alcance de la presente invención, y proporcionan una mayor comprensión de la invención.

40 Ejemplos

La invención se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos que son para dilucidar la invención. No se pretende, y no debe considerarse, que estos ejemplos limiten el alcance de la invención. Los siguientes ejemplos se llevan a cabo usando técnicas convencionales y tales técnicas convencionales las conocen bien y son rutinarias para los expertos en la técnica, excepto cuando se describa otra cosa en detalle.

45 Ejemplo 1.1: Preparación del tampón de la formulación de plataforma

En una realización de la invención, se prepararon 4 litros de tampón acetato. En esta realización, el tampón final comprendía acetato de sodio 50 mM, EDTA 0,05 mM, NaCl 51 mM, arginina al 1,0%, polisorbato 80 al 0,02%, pH 5,5. El tampón se preparó disolviendo acetato de sodio trihidratado, edetato de sodio (EDTA), polisorbato 80 y base libre de L-arginina en 3,5 litros de agua desionizada. Una vez ajustado el pH a 5,5 usando HCl 3 N, se llevó el

volumen a 4,0 litros y el tampón se filtró usando una unidad de filtro de 0,45 µm. Entonces el tampón puede almacenarse a 2-8°C hasta su uso. El “%” de la formulación descrito en la presente solicitud se refiere a “% en volumen”.

Ejemplo 2.1: Preparación de ofatumumab en un tampón de la formulación de plataforma

5 En una realización de la invención, se sometió a diafiltración el ofatumumab en una formulación de plataforma (acetato de sodio 50 mM, NaCl 51 mM, EDTA 0,05 mM, polisorbato 80 al 0,02%, arginina al 1,0% (base libre)), y se concentró para la estabilidad. Se sometió a diafiltración el ofatumumab en la formulación de plataforma usando un sistema de flujo tangencial a escala de laboratorio con tres membranas. Después de la diafiltración en el tampón de plataforma, se concentró el ofatumumab hasta una concentración máxima de 179 mg/ml. El procedimiento completo
10 tardaba aproximadamente tres días de trabajo en completarse y el rendimiento era del 96,1%. Parte de los 179 mg/ml se diluyeron con el tampón de la formulación de plataforma de modo que podía estudiarse un intervalo de concentraciones de ~20 – 179 mg/ml.

Ejemplo 3.1: Preparación de ofatumumab en formulación convencional y de plataforma para la comparación directa del aspecto general (AG)

15 Se preparó un anticuerpo anti-CD20 (ofatumumab) en la formulación convencional y la formulación de plataforma (una realización de la presente invención) a una concentración de 20 mg/ml para la comparación directa del aspecto general a lo largo de un periodo de tiempo de 12 semanas y para los experimentos de agitación. El anticuerpo anti-CD20 en las formulaciones convencional y de plataforma se filtró usando un filtro de membrana de 0,2 µm de baja unión de proteína. Después de la filtración, se cargó cada formulación a 3 ml en viales de 5 cc, se taparon y
20 doblaron hacia dentro, usando una técnica estéril en la campana limpia. Se pusieron dos viales de cada formulación en un agitador con control de temperatura. Se agitaron los viales a 325 rpm a una temperatura de 55°C. Durante la agitación con calentamiento, se observó el aspecto general, tal como se describe en el ejemplo 3.2, de manera periódica a lo largo de un periodo de tiempo de 42 horas. Las figuras 1 y 2 muestran las formulaciones convencional y de plataforma, respectivamente, después de 18,5 horas de agitación con calor. Los resultados del aspecto general
25 del estudio de agitación indicaban que la formulación convencional generará partículas a lo largo del tiempo cuando se somete a agitación a temperaturas de 55°C más rápidamente que la formulación de plataforma.

Ejemplo 3.2: AG, Estudio de agitación de 18,5 h - Aspecto general de ofatumumab, 20 y 100 mg/ml

30 En la tabla a continuación se presenta el aspecto general (AG) de las muestras en un estudio de agitación del AcM anti-CD20. El AG se completó usando un método general que puede usarse para una disolución de anticuerpo IgG que describe el color, la transparencia y la materia particulada visible.

<u>Punto de tiempo de la agitación</u>	<u>Aspecto</u>
Inicial	
Convencional	Transparente, incoloro, 1-2 partículas presentes
Plataforma	Transparente, incoloro, sin partículas
18,5 horas	
Convencional	Transparente, incoloro, varias partículas grandes presentes
plataforma	Transparente, incoloro, sin partículas
42 horas	
Convencional	Turbio, incoloro, varias partículas grandes presentes
Plataforma	Ligeramente turbio, incoloro, sin partículas

Ejemplo 4: Para determinar la estabilidad térmica de la disolución de ofatumumab en el tampón convencional y de plataforma por calorimetría diferencia de barrido (DSC).

35 Con el fin de completar apropiadamente las pruebas por DSC, se adquirieron los barridos de los tampones solos y con proteína. La proteína en las formulaciones convencional y de plataforma se diluyó a 1 mg/ml tal como se presenta en el ejemplo 4.1. Los datos se adquirieron ajustando el DSC a barrido de 5 – 80°C a una velocidad de barrido de 70°C por hora con un equilibrado de 15 minutos antes de cada barrido. El volumen de la celda de muestra de DSC es de ~ 0,5 ml. Después de adquirir los barridos del tampón y la proteína, podían restarse entonces los

5 barridos del tampón del barrido de la proteína. Se obtuvo una concentración de la proteína en las muestras para corregir la concentración en cada barrido (véase, ejemplo 4.2). Se obtuvieron los valores de T_{un} , °C, inicio del desplegamiento, T_m , °C, temperatura de desnaturalización (al máximo de transición) y $T_{1/2}$, °C, la anchura del pico a la mitad de la altura (refleja los cambios en la estructura terciaria y cooperatividad de las transiciones) para el ofatumumab para cada formulación (véase, ejemplo 4.3). Los barridos de DSC reales pueden observarse en la figura 3. Basándose en los resultados de DSC, el ofatumumab tanto en la formulación convencional como en la formulación de plataforma tenía perfiles de DSC similares y por tanto se esperaba que tuviera estabilidad térmica similar.

Ejemplo 4.1: Preparación de la muestra para la caracterización biofísica del estudio de pH de ofatumumab

10 1. Diluciones

pH	Tampón	Con. inicial mg/ml	Dilución a 1 mg/ml para DSC	
			ml de muestra	ml de tampón
6,5 <i>Formulación convencional</i>	<i>citrato 30 mM, NaCl 100 mM</i>	17	0,1	1,6
5,5 <i>Formulación de plataforma</i>	<i>acetato 50 mM, NaCl 51 mM, EDTA 0,05 mM, Arg al 1%, Tween-80 al 0,02%</i>	20	0,075	1,43

Ejemplo .4.2: Mediciones de A280

pH	Tampón	Con. inicial mg/ml	Conc. medida de dilución de 0,5 mg/ml	
			mg/ml	mM*
6,5 <i>Formulación convencional</i>	<i>citrato 30 mM, NaCl 100 mM</i>	17	0,517	0,00345
5,5 <i>Formulación de plataforma</i>	<i>acetato 50 mM, NaCl 51 mM, EDTA 0,05 mM, Arg al 1%, Tween-80 al 0,02%</i>	20	0,444	0,00296

Preparar una muestra, blanco con el correspondiente tampón, leer 3 veces. Usar una cubeta de 1 cm. Restar la absorbancia a A320 antes de dividir entre el coeficiente de extinción (1,49).

Ejemplo 4.3: Resultados de DSC

Muestra	pH	Tampón	T_{un} , °C	T_m , °C	$T_{1/2}$, °C	Notas
Formulación convencional	6,5	citrato 30 mM, NaCl 100 mM	62	68,8	2,9*	Similar a la formulación convencional
Formulación de plataforma	5,5	acetato 50 mM, NaCl 51 mM, EDTA 0,05 mM, Arg al 1%, Tween-80 al 0,02%	60	68,4	3,2*	
* Los valores de $T_{1/2}$ se determinaron manualmente. La contribución exotérmica de la agregación distorsiona el nivel inicial, por tanto estos valores pueden ser artificialmente pequeños.						

- 15 La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la presente invención puede usarse para tratar a un sujeto con un trastorno tumorigénico, p. ej., un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CD20 incluyendo, por ejemplo, linfoma de células B. p. ej., LNH. Los ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen linfoma de células B, p. ej. LNH, incluyendo leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras y neoplasmas de células B maduras, tal como leucemia linfocítica crónica de células B (LLC)/linfoma linfocítico pequeño (LLP), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmácito, linfoma de células del manto (LCM), linfoma folicular (LF), incluyendo LF de grado bajo, grado intermedio y grado alto, linfoma del centro del foliculo cutáneo, linfoma de células B de zona marginal (tipo MALT, tipo nodal y esplénico), tricoleucemia, linfoma de células B grandes y difusas, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo postrasplante, macroglobulinemia de Waldenstrom y linfoma anaplásico de células grandes (LACG).
- 20
- 25 Otros ejemplos de linfomas no Hodgkin de células B son granulomatosis linfomatoide, linfoma de efusión primaria, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes en mediastino, enfermedades de la cadena pesada (incluyendo enfermedades de gamma, mu y alfa), linfomas inducidos por terapia con agentes inmunosupresores, tales como linfoma inducido por ciclosporina y linfoma inducido por metotrexato.

Puede usarse una formulación de anticuerpo anti-CD20 de la presente invención para tratar el linfoma no Hodgkin.

Los ejemplos de trastornos (enfermedades) inmunes en los que las células expresan CD20 que pueden tratarse y/o prevenirse por una formulación de anticuerpo anti-CD20 de la presente invención incluyen enfermedades autoinmunes, tales como psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis, esclerodermia sistémica y esclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de dificultad respiratoria, meningitis, encefalitis, uveítis, glomerulonefritis, eccema, asma, aterosclerosis, deficiencia de adhesión leucocitaria, esclerosis múltiple, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjogren, diabetes de inicio juvenil, enfermedad de Reiter, enfermedad de Behcet, nefritis por inmunocomplejo, nefropatía IgA, polineuropatías IgM, trombocitopenias inmunomediadas, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, anemia hemolítica, miastenia grave, nefritis por lupus, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide (AR), dermatitis atópica, pénfigo, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegener, síndrome de Omenn, insuficiencia renal crónica, mononucleosis infecciosa aguda, VIH y enfermedades asociadas con el virus del herpes. Otros ejemplos son síndrome de dificultad respiratoria grave y coriorretinitis. Además, otras enfermedades y trastornos incluyen los causados por o mediados por infección de células B con virus, tales como el virus de Epstein-Barr (VEB).

Otros ejemplos de trastornos inflamatorios, inmunes y/o autoinmunes en los que los autoanticuerpos y/o la actividad excesiva de linfocitos B son prominentes y que pueden tratarse y/o prevenirse por la formulación de anticuerpo anti-CD20 de la presente invención, incluyen los siguientes: vasculitis y otras enfermedades de los vasos, tales como poliangeítis microscópica, síndrome de Churg-Strauss y otras vasculitis asociadas con ANCA, poliarteritis nudosa, vasculitis crioglobulinémica esencial, angiitis leucocitoclástica cutánea, enfermedad de Kawasaki, arteritis de Takayasu, artritis de células gigantes, púrpura de Henoch-Schonlein, angiitis cerebral primaria o aislada, eritema nudoso, tromboangitis obliterante, púrpura trombocitopénica trombótica (incluyendo síndrome urémico hemolítico), y vasculitis secundaria, incluyendo vasculitis leucocitoclástica cutánea (p. ej., secundaria a hepatitis B, hepatitis C, macroglobulinemia de Waldenstrom, neoplasias de células B, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren o lupus eritematoso sistémico); otros ejemplos son eritema nudoso, vasculitis alérgica, paniculitis, enfermedad de Weber-Christian, púrpura hiperglobulinémica y enfermedad de Buerger; trastornos de la piel, tales como dermatitis de contacto, dermatosis de IgA lineal, vitiligo, pioderma gangrenosa, epidermolisis bullosa adquirida, pénfigo vulgar (incluyendo pénfigo cicatrizal y pénfigoide bulloso), alopecia areata (incluyendo alopecia universal y alopecia total), dermatitis herpetiforme, eritema multiforme y urticaria autoinmune crónica (incluyendo edema angioneurótico y vasculitis urticarial); citopenias inmunomediadas, tales como neutropenia autoinmune y aplasia pura de glóbulos rojos; trastornos del tejido conjuntivo, tales como lupus del SNC, lupus eritematoso discoide, síndrome de CREST, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, polimiositis/dermatomiositis, miositis por cuerpos de inclusión, amiloidosis secundaria, crioglobulinemia de tipo I y tipo II, fibromialgia, síndrome de anticuerpos contra fosfolípidos, hemofilia secundaria, policondritis recidivante, sarcoidosis, síndrome de la persona rígida y fiebre reumática; un ejemplo adicional es la fascitis eosinófila; artritis tales como espondilitis anquilosante, artritis crónica juvenil, enfermedad de Still del adulto y síndrome de SAPHO; otros ejemplos son sacroileítis, artritis reactiva, enfermedad de Still y gota; trastornos hematológicos tales como anemia aplásica, anemia hemolítica primaria (incluyendo síndrome de aglutininas frías), anemia hemolítica secundaria a LLC o lupus eritematoso sistémico; síndrome de POEMS, anemia perniciosa y púrpura hiperglobulinémica de Waldenstrom; otros ejemplos son agranulocitosis, neutropenia autoinmune, enfermedad de Franklin, enfermedad de Seligmann, enfermedad de la cadena mu, síndrome paraneoplásico secundario a timomas y linfomas, y formación de inhibidor del factor VIII; endocrinopatías, tales como poliendocrinopatía y enfermedad de Addison; otros ejemplos son hipoglucemia autoinmune, hipotiroidismo autoinmune, síndrome de insulina autoinmune, tiroiditis de Quervain y resistencia a insulina mediada por anticuerpo frente a receptor de insulina; trastornos hepato-gastrointestinales, tales como enfermedad celiaca, enfermedad de Whipple, cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica y colangitis esclerosante primaria; otro ejemplo es gastritis autoinmune; nefropatías, tales como glomerulonefritis progresiva rápida, nefritis postestreptocócica, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis membranosa y nefritis crioglobulinémica; otro ejemplo es la enfermedad de cambio mínimo; enfermedades neurológicas, tales como neuropatías autoinmunes, mononeuritis múltiple, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, corea de Sydenham, tabes dorsal y síndrome de Guillain-Barré; otros ejemplos son mielopatía/paraparesis espástica tropical, miastenia grave, polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; trastornos cardíacos y pulmonares, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), alveolitis fibrosante, bronquiolitis obliterante, aspergilosis alérgica, fibrosis quística, síndrome de Löffler, miocarditis y pericarditis; otros ejemplos son neumonitis por hipersensibilidad y síndrome paraneoplásico secundario a cáncer de pulmón; trastornos alérgicos, tales como asma bronquial y síndrome de hiper-IgE; otro ejemplo es amaurosis fugax; trastornos oftalmológicos, tales como coriorretinitis idiopática; enfermedades infecciosas, tales como infección por parvovirus B (incluyendo el síndrome de guantes y medias); y trastornos ginecológico-obstétricos, tales como aborto recurrente, pérdida fetal recurrente y retraso del crecimiento intrauterino; un ejemplo más es el síndrome paraneoplásico secundario a neoplasmas ginecológicos; trastornos reproductivos masculinos, tales como síndrome paraneoplásico secundario a neoplasmas testiculares; y trastornos derivados de trasplante, tales como rechazo de aloinjerto y xenoinjerto, y enfermedades de injerto contra huésped.

La enfermedad que implica células que expresan CD20 es un trastorno inflamatorio, inmune y/o autoinmune

seleccionado de colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, diabetes de inicio juvenil, esclerosis múltiple, trombocitopenias inmunomediadas, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, anemia hemolítica (incluyendo anemia hemolítica autoinmune), miastenia grave, esclerosis sistémica y pénfigo vulgar.

REIVINDICACIONES

1. Formulación de anticuerpo anti-CD20 que comprende ofatumumab 20-300 mg/ml, en la que la formulación comprende además acetato de sodio de 10 a 100 mM, cloruro de sodio de 25 a 100 mM, base libre de arginina a del 0,5 al 5%, EDTA de 0,02 a 0,2 mM, polisorbato 80 a del 0,01 al 0,2% y ajustada a pH 5,0 a 7,0.
- 5 2. Formulación de anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en la que la formulación es estable a una temperatura de 5°C durante al menos 2 años.
3. Formulación de anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en la que la formulación es estable a una temperatura de 25°C durante al menos 3 meses.
- 10 4. Formulación de anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en la que la formulación es estable a una temperatura de 40°C durante al menos 1 mes.
5. Formulación de anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en la que la formulación es estable a una temperatura de 55°C durante al menos 1 día.
6. Formulación de anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en la que la formulación es estable en un intervalo de temperatura de 5 a 55°C durante al menos 1 día con agitación.
- 15 7. Formulación de anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en la que el acetato de sodio está presente en una cantidad de 50 mM.
8. Formulación de anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en la que la formulación de anticuerpo anti-CD20 tiene un pH de 5,5.
- 20 9. Formulación de anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en la que el cloruro de sodio está presente en una cantidad de 51 mM.
10. Formulación de anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en la que la base libre de arginina está presente en una cantidad del 1%.
11. Formulación de anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en la que el EDTA está presente en una cantidad de 0,05 mM.
- 25 12. Formulación de anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en la que el polisorbato 80 está presente en una cantidad del 0,02%.
13. Formulación de anticuerpo anti-CD20 que comprende ofatumumab en el intervalo de concentración de 20-300 mg/ml, en la que la formulación comprende además acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 51 mM, base libre de arginina al 1%, EDTA 0,05 mM, polisorbato 80 al 0,02%, y ajustada a pH 5,5.

30

Figura 1

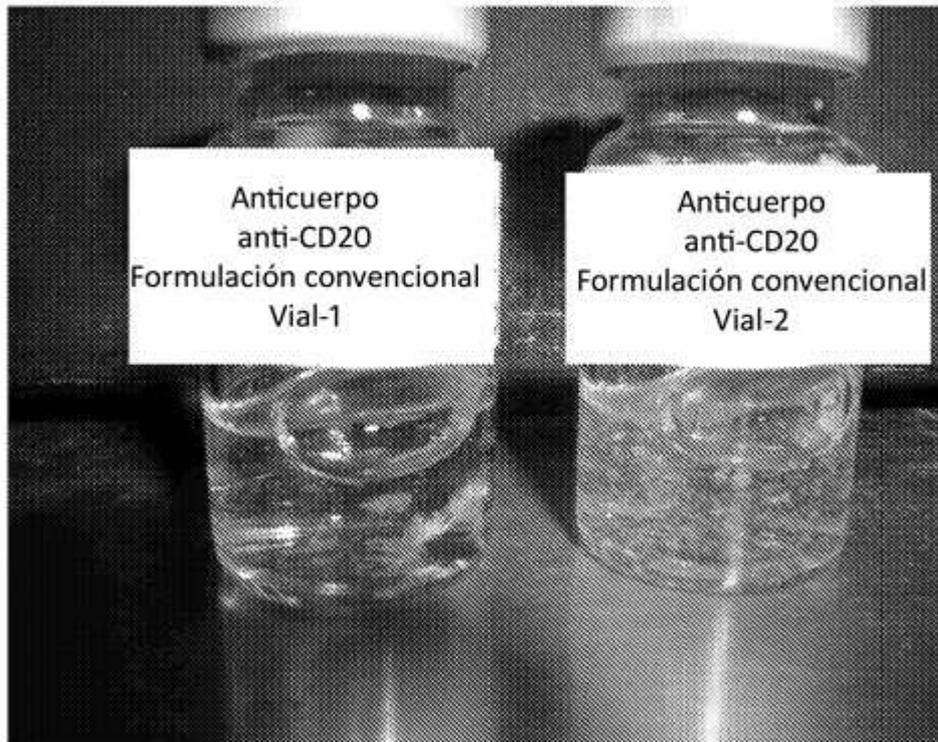


Figura 2

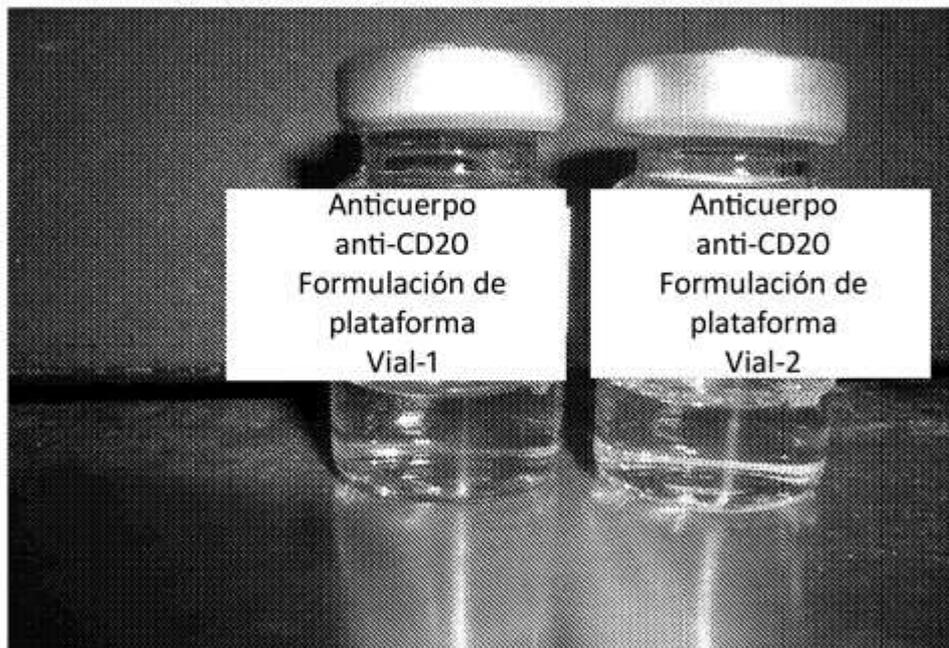


Figura 3: Barrido de DSC

La transición de desplegamiento está acoplada con la agregación. Las T_m aparentes son:

T_m , plataforma = 68,4°C

T_m , convencional = 68,8°C

Una $DT_m > 0,5$ se considera significativa

