



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-91313

54. TÍTULO Formulación de inmenoglobulina y Método de
preparación de la misma

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K

71. SOLICITANTE Elan Pharmaceuticals, Inc

DOMICILIO San Francisco, California, USA.

74. APODERADO Dilia Maria Rodriguez D' Aleman

22. BOGOTÁ, D. C., Agosto 31/05

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

10-09-05

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2) LICITANTE (71)	Nombre: ELAN PHARMACEUTICALS, INC. Dirección: 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos Nacionalidad o domicilio: San Francisco, California, Estados Unidos Lugar de constitución: California, Estados Unidos		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ Cual _____ NÚMERO _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____		
3) REPRESENTANTE APODERADO	Nombre: DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodet.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Ver lista Anexa Nacionalidad o Domicilio: Ver Lista Anexa		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US2004/003873 Fecha: Febrero 9, 2004 Publicación Internacional No. WO 2004/071439 Fecha: Agosto 26, 2004			
6) Título (54) FORMULACIÓN DE INMUNOGLOBULINA Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA MISMA			
7) Clasificación Internacional: A61K 39/00			
8) PRIORIDAD		33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐		Estados Unidos	Febrero 10, 2003
			(31) Número de Solicitud 60/445,818
9) Comprobante de pago N°. 05-64,081 Fecha: Agosto 23, 2005			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina			

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05091313 00000000
Fecha (MM): 2005-09-09 16:21:32
Tramite : 011 PCI-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESELMAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 64,081
FECHA : AGOSTO 23 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE NOBET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	35422040	23/08/2005	3,589,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

10)

ANEX S

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredita la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, Información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
 1. Lista Oficinas designadas
 2. Notificación de la transmisión del reporte de búsqueda
 3. Notificación de la transmisión de la prioridad
 4. Solicitud PCT

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogota TP 20824 CSJ

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

INVENT RES:

1) David J. BURKE
5957 Chabelyn Terrace
Oakland, California 94618
USA
Estadounidense

2) Shaun E. BUCKLEY
427 Stockton Street, #809
San Francisco, California 94108 United States of America
USA
Estadounidense

3) Sherwood Russ LEHRMAN
1731 Penny Way
Los Altos, California 94024
USA
Estadounidense

4) Barbara Horsey O'CONNOR
150 Dale Avenue
San Carlos, California 94070
USA
Estadounidense

5) James CALLAWAY
4893 Drakewood Terrace
San Diego, California 92130
USA
Estadounidense

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 August 2004 (26.08.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/071439 A2

(51) International Patent Classification⁷: A61K
(21) International Application Number: PCT/US2004/003873
(22) International Filing Date: 9 February 2004 (09.02.2004)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English
(30) Priority Data:
60/445,818 10 February 2003 (10.02.2003) US

(74) Agent: REA, Teresa, Stanek et al.; BURNS, DOANE, SWICKER & MATHIS, LLP, PO BOX 1404, Alexandria, Virginia 22313-1404 (US).

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

(71) Applicant (for all designated States except US): ELAN PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 800 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BURKE, David, J. [US/US]; 5957 Chabohyn Terrace, Oakland, California 94618 (US). BUCKLEY, Shaun, E. [US/US]; 427 Stockton St. #809, San Francisco, California 94108 (US). LEHRMAN, Sherwood, Russ [US/US]; 1731 Penny Way, Los Altos, California 94024 (US). O'CONNOR, Barbara, Horsey [US/US]; 150 Dale Avenue, San Carlos, California 94070 (US). CALLOWAY, James [US/US]; 4893 Drakewood Terrace, San Diego, California 92130 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: IMMUNOGLOBULIN FORMULATION AND METHOD OF PREPARATION THEREOF

(57) Abstract: A stable aqueous pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of an antibody, polysorbate 80, a buffer which inhibits polysorbate oxidation is described along with methods of making the preparation. Also described are formulations with high antibody concentrations which maintain fixed volumes and which may be used on patients of variable weight.

WO 2004/071439 A2

IMMUNOGLOBULIN FORMULATION AND METHOD OF PREPARATION THEREOF

FIELD OF THE INVENTION

The invention is directed to stable, concentrated formulations of proteins or antibodies, such as natalizumab, wherein the activity of the antibody is retained and also can be administered in a small volume and can be administered to a subject of variable weight in need thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Antibody and protein formulations are known in the art. However, preparing protein formulations, such as antibody formulations, which are chemically and biologically stable, are fraught with challenges. Preparing formulations which are also not only stable but can maintain a small volume (*i.e.*, allowing for a small volume injection) even with an increased concentration of protein, such as antibody, also is problematic. The need for such formulations exist. For example, concentrated amounts of protein in a fixed volume that is also stable would be especially beneficial to patients of variable weight. Administration of fluids to patients of variable weights may, for example, have an adverse reaction. Development of such formulations has been hindered by the proteins or the antibodies themselves, which have a high tendency to aggregate and precipitate.

SUMMARY OF THE INVENTION

Therefore, notwithstanding what has previously been reported in the literature, there exists a need for improved methods of formulating proteins and/or antibodies. There is also a need for stable formulations with large concentrations of antibody or protein, where the activity of the antibody or protein is retained. Also needed are stable formulations of concentrated protein which maintain a fixed volume. Applicants disclose herein stable compositions which can be further utilized to prepare antibody formulations, especially formulations with high concentrations of antibody which do not precipitate out and are stable when stored at the recommended temperatures. The highly concentrated and stable antibody formulations will greatly aid physicians in treating subjects of variable weights.

One aspect of the invention provides for a stable, aqueous pharmaceutical formulation comprising an immunoglobulin (or other protein), a phosphate buffer, a polysorbate, and sodium chloride. Preferably the polysorbate is polysorbate 80, and preferably in the amount of about 0.001% to about 2.0% (w/v). Most preferably the polysorbate is present in the amount of about 0.02%. In another embodiment, the immunoglobulin or other protein is present in the formulation in an amount of about 0.1 mg/mL to about 200 mg/mL. Preferably the formulation is buffered to a pH between about 3.0 and about 7.0 and most preferably is about 6.0 ± 0.5 . The formulation is preferably isotonic. The formulation may further comprise histidine. Preferably, the histidine is L-histidine.

In another aspect of the invention, the immunoglobulin of the above formulation is an anti- α -4 integrin antibody, such as natalizumab or another humanized antibody or monoclonal antibody. This antibody can be present in a standard amount or in a concentrated amount, *e.g.*, about 15 mg/mL or more. Preferably, the natalizumab is present in an amount from about 20 mg/mL to about 150 mg/mL. In instances wherein the formulation is present in a concentration of about 15 mg/mL or more, this formulation is maintained in a fixed volume, for example, of about 125 mL.

It is a further object of the invention to provide a method of treating a patient with variable weight for a condition with a therapeutic amount of an immunoglobulin comprising administering a formulation as described above and herein, wherein the condition is treated by administration of the formulation. It is a further aspect of the invention that the condition be one that is mediated by α -4 integrin, and in such conditions the immunoglobulin is one which recognizes and binds to α -4 integrin, such as natalizumab.

A further aspect of the invention provides for a composition comprising a sodium phosphate, a polysorbate, a protein and NaCl with a pH of 6.0 ± 0.5 , wherein the composition is stable when stored at 5°C to 8°C for a long period of time.

Another aspect of the invention provides for a method of preparing a stable protein containing formulation comprising admixing sodium phosphate, sodium chloride, a polysorbate and a protein and adjusting the pH of the mixture with phosphoric acid to about $\text{pH } 6.0 \pm 0.5$.

The protein may be lyophilized in the formulation of the present invention. The polysorbate is preferably polysorbate 80k, present in an amount of about 0.02% (w/v), and the protein is preferably natalizumab. The formulation may further comprise histidine.

Preferably, the the protein is lyophilized in a solution comprising 5 mM histidine, 20 mg/mL sucrose and 0.02% polysorbate 80 at a pH 6, and the protein is natalizumab at a concentration of 20 mg/mL.

It is a further object of the invention to provide for an article of manufacture comprising a container holding the stable formulation described above and herein.

Another aspect of the invention provides for a method for treating a patient with variable weight for a condition, comprising simultaneously or sequentially administering to the patient a therapeutically effective combination of a formulation described above and herein and a compound or therapy effective against the condition.

It is a further aspect of the invention to provide a use of any of the stable formulations described herein for the preparation of a medicament for the treatment of a condition wherein the medicament is effective to treat said condition. This medicament may further comprise a second compound or therapy to treat the condition.

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS OF THE INVENTION

1. Definitions

By "protein" is meant to include but is not limited to immunoglobulins, enzymes, receptor, and fragments thereof. Although discussion of the formulation is provided mainly in reference to an antibody or immunoglobulin, other proteins are contemplated as interchangeable in the formulations disclosed.

By "immunoglobulin" is meant to include but is not limited to an antibody and antibody fragment (such as scFv, Fab, Fc, F(ab')₂), and other genetically engineered portions of antibodies. Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, immunoglobulins can be assigned to different classes. There are five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG and IgM. Several of these may be further divided into subclasses (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4; IgA1 and IgA2. The heavy chain constant domains that correspond to the different classes of immunoglobulins are called alpha (α), delta (δ), epsilon (ε), gamma (γ), and mu (μ), respectively. The subunit structures and

three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known. Preferably, the immunoglobulin recognizes and binds to alpha-4 integrin.

The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers monoclonal antibodies (including agonist and antagonist antibodies), antibody compositions with polyepitopic specificity, and antibody fragments (e.g., Fab, F(ab')₂, scFv and Fv), so long as they exhibit the desired biological activity. "Antibody" is meant to include polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, humanized antibodies, human antibodies, primatized[®] antibodies and other antibodies produced via genetic engineering.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations, which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they are synthesized by mammalian cell expression systems or transgenic technology, uncontaminated by other immunoglobulins. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be expressed in goats, as described by Behboodi, et al. (2002) *Transgenic cloned goats and the production of therapeutic proteins*. In *Principles of Cloning*. Elsevier Science (USA); and Meade et al. (1999). *Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals in Gene expression systems: using nature for the art of expression*. J. M. Fernandez and J. P. Hoeffler ed., Academic Press. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the methods described by Shepherd et al., *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (Oxford University Press, 2000).

The term "monoclonal antibodies" also includes "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or

belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity. For example, the ability to bind to alpha-4 integrin. The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described for example in Clackson *et al.*, 1991 *Nature* 352: 624-628 and Marks *et al.*, 1991 *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597. "Humanized" forms of non-human (*e.g.*, murine, rabbit, bovine, equine, porcine, and the like) antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies), which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a complementary determining region (CDR) of the recipient are replaced by residues from a CDR of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibody may comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. These modifications are made to further refine and optimize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin.

The expression "linear antibodies" are also included by the general term "antibody" and are a pair of tandem Fd segments (VH-CH1-VH-CH1), which form a pair of antigen binding regions. Linear antibodies can be bispecific or monospecific.

A "variant antibody" (also included by the generic term "antibody") is a molecule which differs in amino acid sequence from a "parent" antibody's amino acid sequence by virtue of addition, deletion and/or substitution of one or more amino acid residue(s) in the parent antibody sequence. In the preferred embodiment, the variant comprises one or more amino acid substitution(s) in one or more hypervariable region(s) of the parent antibody. For

example, the variant may comprise at least one substitution, e.g., from about one to about ten, and preferably from about two to about five, in one or more hypervariable regions of the parent antibody. Ordinarily, the variant will have an amino acid sequence having at least 75% amino acid sequence identity with the parent antibody heavy or light chain variable domain sequences, more preferably at least 80%, more preferably at least 85%, more preferably at least 90%, and most preferably at least 95%. Identity or homology with respect to this sequence is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical with the parent antibody residues, after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. None of the N-terminal, C-terminal, or internal extensions, deletions, or insertions into the antibody sequence should be construed as affecting sequence identity or homology.

To analyze such properties, one should compare a Fab form of the variant to a Fab form of the parent antibody or a full length form of the variant to a full length form of the parent antibody, for example, since it has been found that the format of the antibody impacts its activity in the biological activity assays disclosed herein. The variant antibody of particular interest is one which displays at least about 10 fold, preferably at least about 20 fold, and most preferably at least about 50 fold, enhancement in biological activity when compared to the parent antibody. The "parent" antibody is one which is encoded by an amino acid sequence used for the preparation of the variant. Preferably, the parent antibody has a human framework region and has human antibody constant region(s). For example, the parent antibody may be a humanized or a human antibody.

An "isolated antibody" is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or non-reducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody in situ within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not

be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, generally the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments. "Single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments comprise the VH and VL domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the VH and VL domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding.

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy chain variable domain (VH) connected to a light chain variable domain (VL) in the same polypeptide chain (VH-VL). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. The route of antibody administration is in accord with known methods and are well known, and may include, for example, injection or infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, or intralésional routes, or by sustained release systems. The antibody can be administered continuously by infusion or by bolus injection. Therapeutic antibody compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle. "Pharmaceutically acceptable" excipients (e.g., vehicles, additives) are those which can reasonably be administered to a subject mammal to provide an effective dose of the active ingredient employed. A "stable" formulation is one in which the protein therein essentially retains its physical stability and/or chemical stability and/or biological activity upon storage. By "stable" is also meant a formulation which exhibits little or no signs of instability, including aggregation and/or deamidation. For example, the formulations provided by the present invention may remain stable for at least two years, when stored as indicated at a temperature of 5-8°C.

Various analytical techniques for measuring protein stability are available in the art and are reviewed in *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301 (Vincent Lee ed., New York, N.Y., 1991) and Jones, 1993 *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90, for examples.

Stability can be measured at a selected temperature for a selected time period as exemplified by the provided examples. Storage of stable formulations is preferably for at least 6 months, more preferably 12 months, more preferably 12-18 months, and more preferably for 2 or more years.

5 A protein, such as an antibody or fragment thereof, "retains its physical stability" in a pharmaceutical formulation if it shows no signs of aggregation, precipitation, deamidation and/or denaturation upon visual examination of color and/or clarity, or as measured by UV light scattering or by size exclusion chromatography.

10 A protein "retains its chemical stability" in a pharmaceutical formulation, if the chemical stability at a given time is such that the protein is considered to still retain its biological activity. Chemical stability can be assessed by detecting and quantifying chemically altered forms of the protein. Chemical alteration may involve size modification (e.g., clipping), which can be evaluated using size exclusion chromatography, SDS-PAGE
15 (MALDI/TOF MS), for examples. Other types of chemical alteration include charge alteration (e.g., occurring as a result of deamidation), which can be evaluated by ion-exchange chromatography, for example. An antibody "retains its biological activity" in a pharmaceutical formulation, if the biological activity of the antibody at a given time is within about 10% (within the errors of the assay) of the biological activity exhibited at the time the
20 pharmaceutical formulation was prepared as determined in an antigen binding assay, for example.

 By "isotonic" is meant that the formulation of interest has essentially the same osmotic pressure as human blood. Isotonic formulations will generally have an osmotic pressure from about 250 to 350 mOsm. Isotonicity can be measured using a vapor pressure
25 or ice-freezing type osmometer, for example.

 As used herein, "buffer" refers to a buffered solution that resists changes in pH by the action of its acid-base conjugate components. The buffer of this invention has a pH in the range from about 3.0 to about 7.5; preferably from about pH 4.0 to about 7.0; more preferably from about pH 5.0 to about 6.5; and most preferably has a pH of about 6.0 ± 0.5 . A pH of any
30 point in between the above ranges is also contemplated.

 In a pharmacological sense, in the context of the present invention, a "therapeutically effective amount" of an antibody refers to an amount effective in the prevention or treatment

~~32~~
14

of a disorder for the treatment of which the antibody is effective. A "disorder" is any condition that would benefit from treatment with the antibody or protein. This includes chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions which predispose the mammal to the disorder in question.

5 "Treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those in which the disorder is to be prevented.

A "preservative" is a compound which can be included in the formulation to essentially reduce bacterial action therein, thus facilitating the production of a multi-use
10 formulation, for example. Examples of potential preservatives include octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride, hexamethonium chloride, benzalkonium chloride (a mixture of alkylbenzyldimethylammonium chlorides in which the alkyl groups are long-chain compounds), and benzethonium chloride. Other types of preservatives include aromatic alcohols such as phenol, butyl and benzyl alcohol, alkyl parabens such as methyl or
15 propyl paraben, catechol, resorcinol, cyclohexanol, 3-pentanol, and m-cresol.

By "patient" or "subject" is meant to include any mammal. A "mammal," for purposes of treatment, refers to any animal classified as a mammal, including but not limited to humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, horses, cats, cows, and the like. Preferably, the mammal is human.

20 By "Antegren®" and is meant to include the antibody also known as AN100226 (antibody code number) or natalizumab (USAN name). Natalizumab is a recombinant, humanized anti-alpha-4 integrin antibody. Preferably the disease or condition being treated in the mammal is one which is modulated when a therapeutically effective dose of natalizumab is administered.

25 By "stable" is meant a formulation which exhibits little or no signs of instability, including aggregation and/or deamidation. In addition, "stable" may also refer to a formulation which does not exhibit any signs of instability for greater than or equal to two years, when stored as indicated at

30 2. General Description

In the discussion below and the examples to follow, formulations for stable antibody formulations are disclosed. Certain stable formulations disclosed have high concentrations of

antibody but maintain a fixed volume, wherein the antibodies in these formulations are stable and the antibody does not precipitate out of solution or aggregate. Proteins other than antibodies are also contemplated for the high concentration formulations.

Antibodies are typically administered to a subject (e.g., a human) at a concentration of about 0.01 mg/mL to about 200 mg/mL. More typically, antibodies range in concentration from about 0.1 mg/mL to about 150 mg/mL. However, instances exist when greater concentrations are required to be administered to a patient, e.g., about 15 to about 200 mg/mL, more preferably about 15 mg/mL to 150 mg/mL, more preferably about 20 to about 50 mg/mL, and most preferably about 20 mg/mL and any integer value in between.

The antibody formulation may be administered to a mammal in need of treatment with the protein, in accordance with known methods. These methods may include, but are not limited to intravenous administration as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes. In preferred embodiments, the antibody formulation is administered to the mammal by intravenous administration.

The appropriate dosage of the protein will depend, for example, on the condition to be treated, the severity and course of the condition, whether the protein is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the protein, the type of protein used, and the discretion of the attending physician.

The protein is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments and may be administered to the patient at any time from diagnosis onwards. The protein may be administered as the sole treatment or in conjunction with other drugs or therapies useful in treating the condition in question. As used herein, two (or more) agents are said to be administered in combination when the two agents are administered simultaneously or are administered independently in a fashion such that the agents will act contemporaneously.

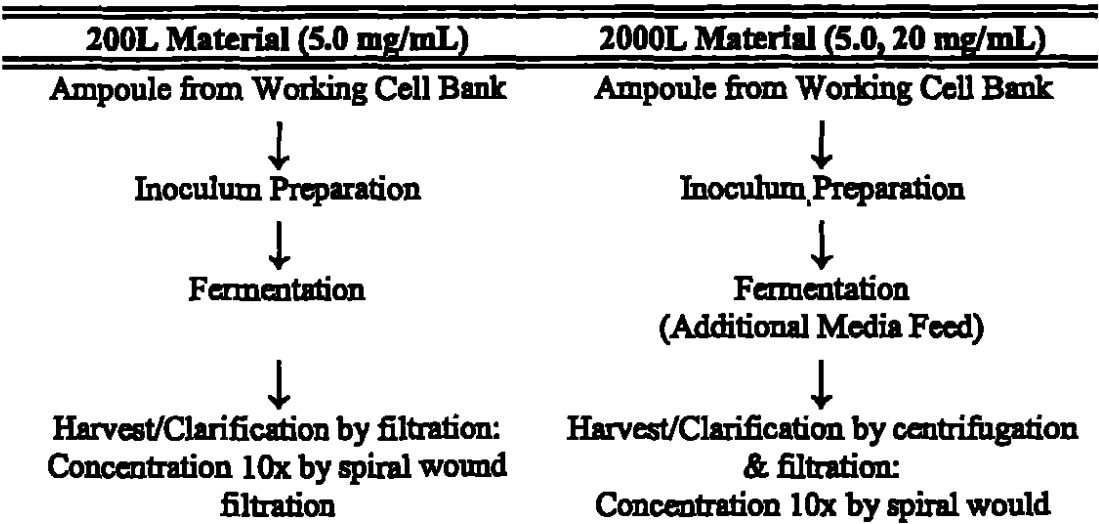
In practicing the methods of this invention, the compounds of this invention may be used alone or in combination, or in combination with other therapeutic agents. In certain preferred embodiments, the compounds of this invention may be co-administered along with other compounds typically prescribed for these conditions according to generally accepted medical practice. For example, the formulations of this invention can be administered in combination with other therapeutic agents or physical therapies for the treatment of rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and Crohn's Disease.

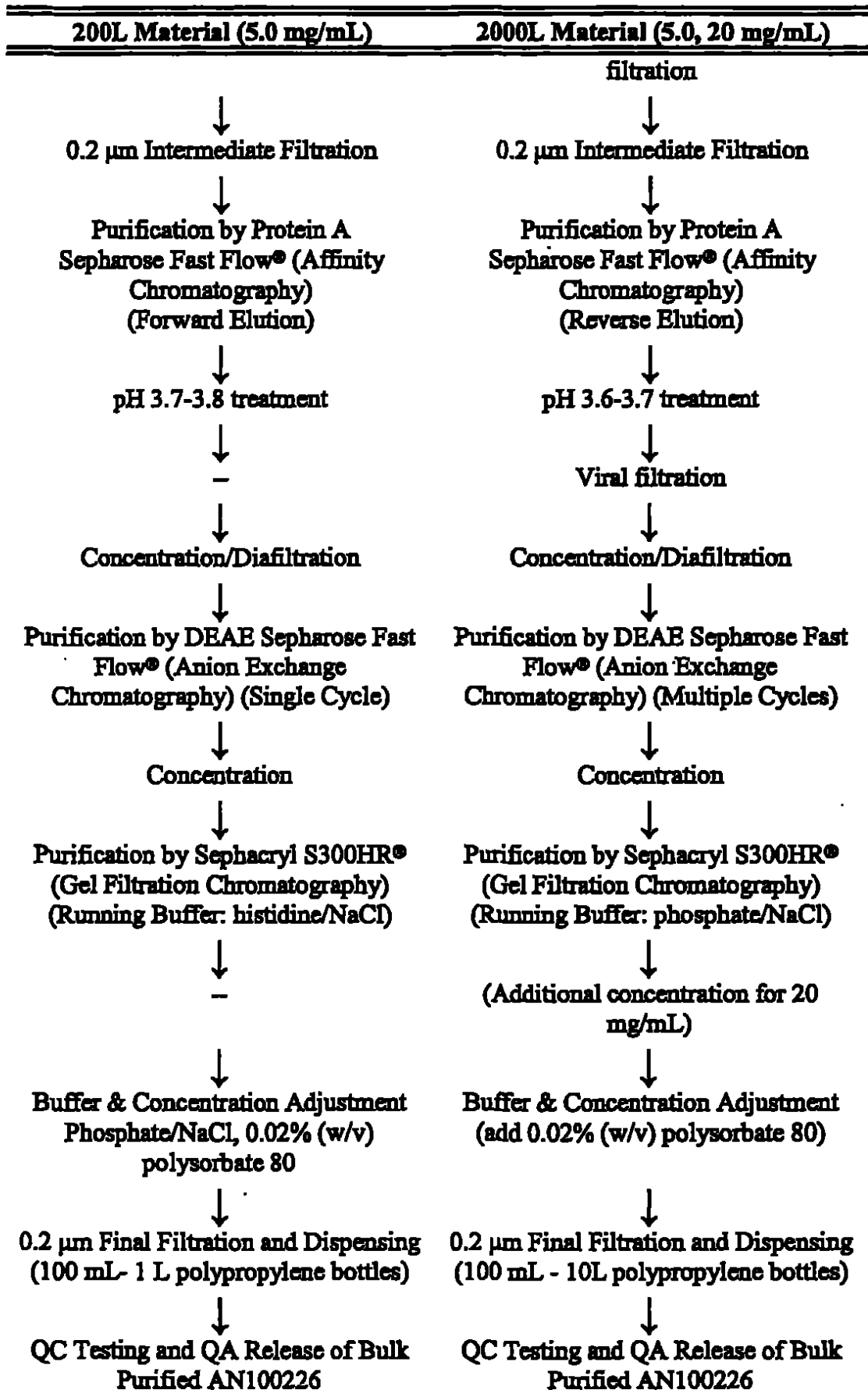
21

2.1 Method of Making The Antibody Formulation

The process can be altered as would be known to the skilled artisan, but generally would follow a procedure such as the following. Obtain an ampoule from a working cell bank which contains cells which make the antibody or protein of interest. Prepare the inoculum. Culture or ferment the cells with additional feedings as is necessary. Harvest/clarify the cells by centrifugation and/or filtration. This can be done for example by concentrating the cells 10 fold by spiral wound filtration. Filter by a 0.2 μ m intermediate filtration followed by purification by protein A Sepharose Fast Flow® (i.e., affinity chromatography) and reverse elution. The antibody containing composition then receives a treatment at pH 3.6-3.7. The mixture then receives a viral filtration followed by a concentration/diafiltration step. The composition can then be purified by DEAE Sepharose Fast Flow® (anion exchange). This step can be performed multiple times. From this point, the composition is then further concentrated followed by a purification step using Sephacryl S300HR® (i.e., gel filtration chromatography) system, wherein the running buffer used is phosphate/NaCl. The antibody containing composition can be further concentrated for the high concentration formulations (e.g., 20 mg/mL or more) if so desired. The antibody containing composition is then further buffered and the concentration adjusted by adding 0.02% (w/v) polysorbate 80. This composition then receives a final filtration using a 0.2 μ m filter and can be dispensed at this point into 100 mL to 10 L polypropylene bottles. The antibody or immunoglobulin so obtained can then be QC tested and QA released.

The above can be done, for example for natalizumab, as diagramed below:





2
18

2.2 The Antibody Formulation

In one aspect of the invention, an immunoglobulin is formulated in concentrations of about 1.7, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0 or 50.0 mg/mL in 10 mM sodium phosphate, 140 mM NaCl (pH 6.0 ± 0.5) and 0.02% polysorbate 80. If necessary, the pH is adjusted to 5 6.0 ± 0.5 with phosphoric acid.

One example of the different formulations is displayed below.

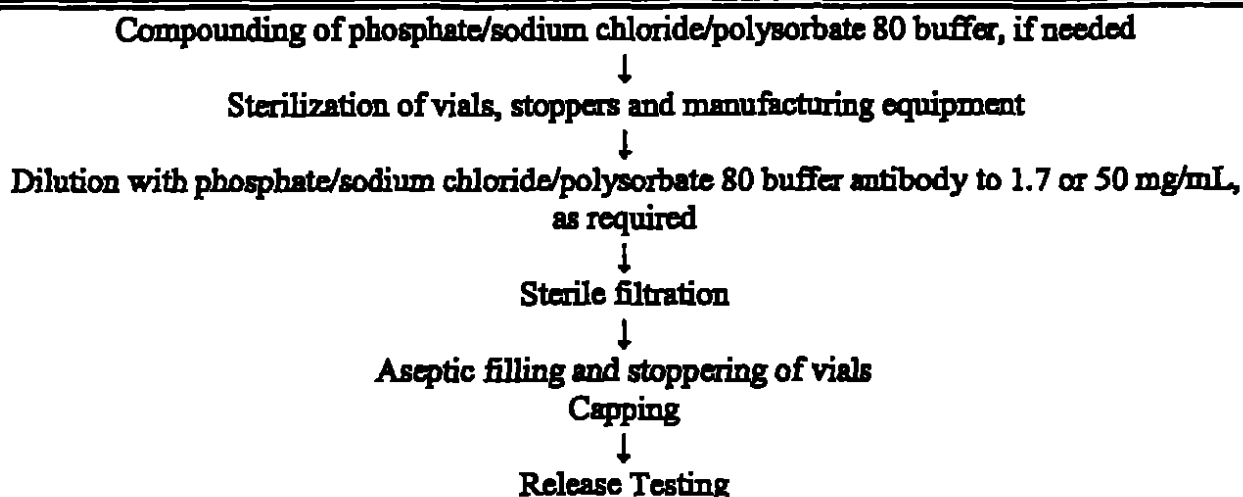
QUANTITATIVE COMPOSITION: PHOSPHATE BUFFER FORMULATION

Component	Function	Unit Formula (per mL) 1.7 mg/mL	Unit Formula (per mL) 5.0 mg/mL	Unit Formula (per mL) 20 mg/mL
<u>Active Ingredient:</u>				
Anti-α4 integrin humanized monoclonal antibody	Active	1.7 mg	5.0 mg	20 mg
<u>Other Ingredients:</u>				
Sodium Phosphate, USP	Buffer and tonicity	1.4 mg	1.4 mg	1.4 mg
Sodium chloride, USP	Buffer and tonicity	8.2 mg	8.2 mg	8.2 mg
phosphoric acid, NF	Adjust pH to 6.0 ± 0.5	QS	QS	QS
Polysorbate 80, NF	Inhibit protein aggregatio n	0.2 mg	0.2 mg	0.2 mg
Water for Injection, USP	Diluent	QS to 1 mL	QS to 1 mL	QS to 1 mL

10

Any of the above formulations are optimally vialled in an aseptic vial. These vials can be, for example, Type I EP neutral glass vials (e.g., 5.0 or 20 mL fill vials) with Helvoet Pharma V9145/FM 157/1 gray butyl rubber stoppers with aluminum seals. However other suitable aseptic vials are also contemplated. For example, the formulations can be bottled as 15 follows:

BOTTLING



More specifically, natalizumab obtained for example by the procedures discussed above, can be bottled as follows. Natalizumab 200 L and 2000 L drug product can be filled on a fully automated filling line equipped with a vial washing, sterilization and
5 depyrogenation tunnel. Stoppers, seals and filling equipment are washed and sterilized prior to use. This process allows for large scale filling operations consistent with the volumes produced from the 2000 L fermentation.

When necessary, the formulation buffer, about 10 mM phosphate, about 140 mM NaCl, pH 6.0 ± 0.5 , about 0.02% polysorbate 80, can be compounded in a Class 10,000 suite
10 and used to dilute the bulk drug product to the final concentration. In-process specifications of concentration, pH and density are preferably reached prior to filtration.

The formulated natalizumab or other immunoglobulin can be sterile filtered through a 0.2 μm Millipak filter into a stainless steel surge tank inside the sterile core. Filling, stoppering and capping of natalizumab is fully automated. In-process samples for bulk
15 sterility are collected; fill weight and headspace testing is conducted throughout the filling operation. Filled drug product is stored under refrigeration at about 2-8°C.

Filling occurs within a fully validated Class 100 sterile core. The filling line is validated to provide fill volumes within expected tolerances for the 5.0 mL and 20 mL fill volumes. Comprehensive environmental monitoring is conducted throughout the filling
20 operation and reviewed to verify continual compliance with this standard. Media fills are conducted on a quarterly basis to support aseptic filling operations.

20

Alternatively, the 200 L drug substance material produced can be bottled pursuant to the following example. Vials, filling needles, the filtration assembly and tubing are prepared and sterilized prior to use. Stoppers can be prepared by the supplier. The stoppers are then sterilized prior to filling.

5 Natalizumab drug product or other protein is filled on a semi-automatic filling line, with batch preparation of components, automated filling, immediate stoppering, and a subsequent capping operation. This operation is appropriate for small batch scale operations.

10 The final bulk solution is then sterile filtered through a 0.2 μ m Millipak filter into a sterile glass receiving vessel within a Class 100 environment. Regular calibration and in-process checks ensure that the filling tolerance remains within $\pm$ 2%. Vials are stoppered and capped immediately. Filled drug product is preferably stored refrigerated at 2-8°C.

15 The glass receiving vessel can be any number of vials, but can for example be a 5.0 or 20 mL neutral glass vial Type I (EP) supplied by, for example, Epsom Glass or AMILCO or a 5.0 mL or 20 mL USP Type I borosilicate glass vial, supplied by, for example Kimble or Wheaton. These vials can use any means of closure suitable. Vial closures include, but are not limited to a 13 mm Helvoet Pharma V9145/FM 157/1 grey butyl rubber stopper or a 13 mm and 20 mm Helvoet Pharma V9145/FM 157/1 grey butyl rubber stopper or a 13 mm or 20 mm West 4432/50 gray butyl rubber stopper. The rubber-stoppered bottled is then sealed most typically using an aluminum seal, such as that manufactured by West.

20 Although the present invention has been described in detail with reference to examples below, it is understood that various modifications can be made without departing from the spirit of the invention, and would be readily known to the skilled artisan.

25 **EXAMPLES**

Example 1

Selection of Polysorbate 80

30 The typical method of administering natalizumab is intravenous. Intravenous administration requires the final formulation to be isotonic. A formulation of AN100226 (natalizumab), 5 mg/mL in 50 mM L-histidine, 150 mM NaCl, pH 6.0 was initially chosen (Formulation #1). During a Phase II study, protein precipitation of the antibody was

12

observed during the dilution and introduction of natalizumab into the clinical dosing apparatus. Polysorbate 80 was introduced into the formulation (Formulation #2) to resolve the observed protein precipitation. Preferably, the polysorbate for use with the present invention is low in peroxide, *i.e.*, polysorbate from Sigma, Product number P6479, Lot Number 071K7283.

The two factors that have been shown to accelerate the precipitation of the AN100226 antibody are the presence of trace levels of silicone oil and denaturation at the air-liquid interface. The silicone oil was introduced into the product upon use of standard lubricated polypropylene syringes equipped with siliconized rubber stoppers. The introduction of the silicone oil is sufficient to cause discernible antibody precipitation in Formulation # 1 upon gentle agitation and room temperature storage. The aggregation, deamidation and subsequent precipitation caused by denaturation at the air-liquid interface has become more discernable problematic with the drug being shipped to more clinical sites. Both causes of protein precipitation have been resolved by the addition of polysorbate 80 at a concentration of 0.02% (w/v).

Formulation #2 shows comparable stability to the histidine/NaCl formulation (Formulation #1) in all protein characterization assays, while providing increased stability during product shipping and handling in the clinical setting.

The addition of polysorbate 80 to the formulation also overcomes the problem of precipitating or aggregating antibody when preparing formulations with higher protein content. Initial work focused on agitation-induced aggregation at high protein concentrations, including 50 mg/mL. By subjecting the material to agitation using a vortex-type mixer, aggregated species were detected by size exclusion-high performance liquid chromatography (SEC-HPLC). This model identified polysorbate 80 as an effective inhibitor of aggregation, while sucrose and other buffering components had little beneficial effect.

The effectiveness of the addition of 0.02% (w/v) polysorbate 80 in preventing agitation-induced precipitation at a protein concentration of 5 mg/mL was assessed following addition of 10 μ L of a 10% polysorbate 80 solution to vials of natalizumab (Lot No. AN100226-0003). The vials were shaken on their sides along with several vials of natalizumab in Formulation #1 at 150 rotations per minute in a horizontal plane. Within 3 hours of this treatment at room temperature, the vials of Formulation #1 were laden with

particles and appeared turbid while the vials with 0.02% (w/v) polysorbate 80 remained clear and free of particles.

The observed aggregation is presumed to be caused by the air-surface interface, as vials completely filled with AN100226 in the absence of polysorbate 80 were shaken for
5 extended periods of time without additional particle formation being induced.

An evaluation of the ability of 0.02% (w/v) polysorbate 80 to inhibit the protein precipitation facilitated by trace levels of silicone was conducted. A vial of natalizumab (Lot No. AN100226-0003) was adjusted to 0.02% (w/v) polysorbate 80 and drawn into a commercially available, lubricated 60 mL polypropylene syringe. The material was allowed
10 to stand for several hours at room temperature. Visual inspection confirmed that no precipitation was occurring. The material was then filtered through a 0.2 µm filter into a 5-mL vial and inspected and found to be substantially free of particles after several days, while vials treated in the same manner in the absence of polysorbate 80 (Formulation #1) were laden with particles.

15

Example 2

Selection of The Phosphate Buffer

During release testing of the histidine placebo (containing 0.02% w/v polysorbate 80), new trace impurities were detected. These impurities arose from degradation of polysorbate
20 80, apparently through an oxidation reaction involving metal ions and histidine. For active natalizumab drug product, these trace impurities have been detected only after storage at elevated temperatures (e.g., 25°C and 40°C). Thus, the decision was made to modify the placebo and use phosphate to replace histidine in the buffer. The lot of histidine used in the product placebo was different than that used for the active natalizumab drug product lots
25 AN100226-004 and AN100226-005. The impact of the source of histidine on polysorbate 80 degradation is discussed in greater detail infra.

During testing of the placebo, trace impurities were detected in the histidine/NaCl/0.02% (w/v) polysorbate 80 placebo (Formulation #2). These impurities were detected by their absorbency in the low wavelength ultraviolet region. The absorbency
30 profiles from 200 to 400 nm for placebo stored at 5°C, 25°C, and 40°C for one month were

determined. These data indicate that the impurities are increasing as a function of temperature.

The size exclusion HPLC method used to monitor antibody aggregation was modified to increase sensitivity for detection of the trace impurities by increasing the column load 5-fold to 100 μ L, and the sample is applied undiluted rather than 10-fold diluted. In addition, the absorbency is monitored at 260 nm to reflect the absorbency maximum of the impurities. The method provides a tool to evaluate the presence of these trace impurities in both placebo and product, as the antibody emerges much earlier in the elution profile.

Placebo and natalizumab final drug product formulated in Formulations #1 and #2 were analyzed by the SEC-HPLC method described above. Analysis of the placebo in Formulation #1 spiked with polysorbate 80 to 0.02% (w/v) was performed just prior to chromatography. This shows the UV absorbency of polysorbate 80, histidine, and salt in the absence of the trace impurities. The broad peak at 16 minutes is associated with polysorbate 80 while the peaks at approximately 26-27 minutes are attributed to histidine and salt. The histidine/NaCl/0.02% (w/v) polysorbate 80 placebo (Formulation #2) stored at 5°C for two months shows a marked increase in the late eluting peaks which implicates polysorbate 80 in the production of these impurities. In addition, the eluting at 16 minutes disappeared, indicating that the polysorbate 80 has been degraded.

AN100226 stored as bulk drug substance for approximately 5 months at 5°C in Formulation #1 was analyzed after spiking with polysorbate 80 to 0.02% (w/v) just prior to chromatography. The antibody elutes at 16-18 minutes using these overload conditions. The remainder of the profile resembles the placebo with polysorbate 80 spike. The two-month stability samples for natalizumab lot #AN100226-0004 were also analyzed by this method. The elution profile for the 5°C natalizumab sample indicates the absence of any additional peaks and comparable levels of the histidine/salt peaks at 26-27 minutes. The trace impurities are detected at two months for the 25°C sample, and elevated levels are present for the two month 40°C sample. Thus, these impurities have not been detected in the clinical supplies, which are stored at 5°C. The appearance of these trace impurities is occurring much more rapidly in placebo than in natalizumab.

To avoid the formation of these impurities in the placebo, histidine was replaced with inorganic buffering components in the placebo formulation. The placebo product for the

32

clinical trials is a sterile isotonic phosphate buffered solution with 0.02% (w/v) polysorbate 80 at pH 6.0. The substitution of histidine with phosphate was demonstrated to significantly reduce the rate of polysorbate 80 degradation. 100 μ L of the phosphate/NaCl/0.02% (w/v) polysorbate 80 placebo formulation was analyzed by size exclusion HPLC monitored at 260 nm both at time zero and after 3 days at 60°C. Little change is seen in the SEC-HPLC profile as a result of this incubation. The SEC-HPLC profile for the histidine/NaCl/0.02% (w/v) polysorbate 80 formulation following only two days at 60°C shows significant levels of trace impurities related to the degradation of polysorbate 80. These data demonstrate that the polysorbate 80 degradation is significantly impeded by replacing histidine with phosphate in the placebo formulation.

Example 3

Natalizumab Formulation with Polysorbate 80 and Histidine Combined

The mechanism by which these trace impurities are produced is thought to be through a metal catalyzed oxidation of polysorbate (see Donbrow *et al.*, 1978 *J. Pharmaceutical Sciences*, 67(12): 28). Donbrow describes that autoxidation during storage occurs for different types of polysorbate (*e.g.*, polysorbate 20). Light, temperatures and metal ions also impact autoxidation. Donbrow *et al.* (1978). It has been confirmed that both histidine and polysorbate 80 are required for this reaction to proceed at a significant rate. Ajinomoto is the single histidine source used for formulation. However significant differences in the rate of reaction between lots supplied by the Ajinomoto have been observed.

An additional factor that plays a role in accelerating the reaction is the presence of metal. This was demonstrated by running a reaction at 60°C for five days in glass vessel with 50 mM histidine (Lot No. R016A008) and 2% (w/v) polysorbate 80. Under these conditions, minimal levels of the trace impurities are produced for this histidine lot. The reaction was then split into three vessels: (1) the first vessel remained as the control; (2) a gray butyl container closure (stopper) was added to the second vessel; and (3) a stainless steel needle was added to the third vessel. These reactions were then run for four days at 60°C and analyzed by a UV scan from 200 to 400 nm. The reaction progressed further over this time period in the presence of the needle.

52

Example 4

Evaluation of Impurities — Mouse Single-Dose Limit Test

The potential toxicity of these impurities was evaluated in a mouse single-dose limit test. Histidine placebo and natalizumab samples in Formulation #2 stored at 40°C for six weeks were used because these samples provide the largest amount of the impurities. There were no signs of toxicity due to the impurities. Preliminary data are provided in the non-clinical section of the submission.

The SEC-HPLC profiles for 100 µL injections of samples used in the mouse single-dose limit test were determined. The natalizumab sample in Formulation #1 spiked with polysorbate 80 prior to analysis has little 260 nm absorbing material eluting after 20 minutes. The peak eluting at 34 minutes was found in this lot of natalizumab without polysorbate 80 addition and therefore does not indicate polysorbate 80 degradation. By contrast, the placebo in Formulation #2 stored at 40°C for six weeks, showed complete degradation, as the total area under the curve was 12.8 million µV·seconds. The natalizumab sample in Formulation #2 and stored at 40°C for six weeks had less complete degradation. The analysis confirms that the samples stored at 40°C and tested in the mouse single-dose limit test are laden with degraded polysorbate 80.

Example 5

Establishing Impurity Specifications

To assess if partially degraded polysorbate 80 is still capable of preventing antibody aggregation, Formulation #2 was heated to 60°C for 3 days in the presence of a needle to convert all the polysorbate 80 to the maximum levels of impurities. The reaction was confirmed to have degraded all the polysorbate 80 by both SEC and reverse phase HPLC. This material was diluted one-to-one with a 10 mg/mL solution of AN100226 in Formulation #2 resulting in a solution containing 0.01% (w/v) polysorbate 80 and 50% of the maximum level of degraded polysorbate 80. These antibody solutions were exposed to both shaking and siliconized syringes for several hours; aggregation of the antibody was prevented. The control samples exposed to the same conditions but without polysorbate 80 showed significant precipitation.

It is concluded from this work that as long as no more than fifty percent of the polysorbate 80 is degraded, this material can provide the appropriate environment to prevent antibody aggregation.

Although very little polysorbate degradation is occurring in the active drug product, monitoring the isoelectric focusing (IEF) pattern is done to confirm that this formulation is not compromising the antibody. IEF profiles for the six week stability time points for 5°C, 25°C and 40°C storage conditions were determined. Both the 5°C and 25°C samples are comparable to the reference standard, with no evidence of any change in overall charge of the protein. The 40°C sample showed the shift to a more acidic species typical of this product in a liquid formulation either in the presence or absence of polysorbate 80.

To establish a relationship between the extent of polysorbate 80 degradation and the peak area from the SEC-HPLC, a dilution series for six concentrations of degraded polysorbate 80 from 0 to 50% was evaluated. Formulation #2 was heated to 60°C for 3 days with a needle and confirmed to be 100% degraded by SEC and reverse phase HPLC. The reaction mixture was then diluted with AN100226 purified bulk in Formulation #1, freshly spiked with 0.02% (w/v) polysorbate 80 and analyzed by SEC-HPLC. The SEC profiles were monitored at 260 nm.

The data from this dilution series were plotted by the total peak area integrated ($\mu\text{V}\cdot\text{seconds}$) for the absorbency profile after approximately 24 minutes as a function of the ratio of degraded polysorbate 80. This plot indicates that an area of less than 5 million $\mu\text{V}\cdot\text{seconds}$ represents about a 50% loss of polysorbate 80 to degradation products. There is a direct relationship between the amount of oxidized polysorbate 80 added and the peak area for the peaks eluting late in the chromatogram.

A preliminary limit for these trace impurities in natalizumab has been established based on the mouse single-dose limit test, the antibody solubility data with 50% degraded polysorbate 80, and estimates of the extent of the polysorbate 80 degradation. The method has been included in the ongoing stability program and a limit has been established. If additional lots are manufactured with histidine buffer, these limits will be applied at time of release as well.

Limit: total area under the peaks after approximately 24 minutes is not to exceed $4 \times 10^6 \mu\text{V}\cdot\text{seconds}$.

**Example 6****1.7 mg/mL Natalizumab Formulation**

5 1.7 mg Natalizumab
 1.4 mg Sodium phosphate, USP
 8.2 mg Sodium chloride, USP
 0.2 mg Polysorbate 80, NF

Adjust pH to 6.0 ± 0.5 with phosphoric acid, NF. QS to 1 mL. With preferred storage at 5-8°C.

10

Example 7**5.0 mg/mL Natalizumab Formulation**

15 5.0 mg Natalizumab
 1.4 mg Sodium phosphate, USP
 8.2 mg Sodium chloride, USP
 0.2 mg Polysorbate 80, NF

Adjust pH to 6.0 ± 0.5 with phosphoric acid, NF. QS to 1 mL. With preferred storage at 5-8°C.

20

Example 8**20 mg/mL Natalizumab Formulation**

25 20.0 mg Natalizumab
 1.4 mg Sodium phosphate, USP
 8.2 mg Sodium chloride, USP
 0.2 mg Polysorbate 80, NF

Adjust pH to 6.0 ± 0.5 with phosphoric acid, NF. QS to 1 mL. With preferred storage at 5-8°C.

Example 9**50.0 mg/mL Natalizumab Formulation**

50.0 mg Natalizumab
1.4 mg Sodium phosphate, USP
8.2 mg Sodium chloride, USP
0.2 mg Polysorbate 80, NF

Adjust pH to 6.0 ± 0.5 with phosphoric acid, NF. QS to 1 mL. With preferred storage at 5-8°C.

Example 10**5.0 mg/mL Natalizumab Formulation**

5.0 mg/mL natalizumab
140 mM NaCl
0.02% Polysorbate 80 (w/v)
10 mM sodium phosphate

Adjust pH to 6.0 ± 0.5 with phosphoric acid. Optimally store formulation at about 5°C to about 8°C.

Example 11**10 mg/mL Natalizumab Formulation**

10.0 mg Natalizumab
1.4 mg Sodium phosphate, USP
8.2 mg Sodium chloride, USP
0.2 mg Polysorbate 80, NF

Adjust pH to 6.0 ± 0.5 with phosphoric acid, NF. QS to 1 mL. With preferred storage at 5-8°C.

22

Example 12**10 mg/mL Natalizumab Formulation**

10.0 mg Natalizumab
1.4 mg Sodium phosphate, USP
8.2 mg Sodium chloride, USP
0.1 mg Polysorbate 80, NF

Adjust pH to 6.0 ± 0.5 with phosphoric acid, NF. QS to 1 mL. With preferred storage at 5-8°C.

Example 13**20 mg/mL Natalizumab Formulation**

20.0 mg/mL Natalizumab
140 mM NaCl
0.02% Polysorbate 80 (w/v)
10 mM sodium phosphate

Adjust pH to 6.0 ± 0.5 with phosphoric acid and bring volume to 125 mL. Optimally store formulation at about 5°C to about 8°C.

Example 15**Lyophilized Natalizumab Formulation**

Additional liquid formulations of antibody at high concentration, from 20 –200 mg/mL may consist of phosphate or other suitable buffer (such as histidine, citrate, acetate or succinate) in the concentration range of 2 to 50 mM, to provide buffering in the pH range of 3.0 to 7.0. Most preferably, the pH is 6.0, +/- 0.5. The addition of polyols (such as sorbitol and mannitol), disaccharides (such as sucrose or trehalose) and amino acids (such as glycine) may be added in varying amounts with sodium chloride to maintain stability and provide an isotonic solution. The use of surfactants, such but not limited to the polysorbates, add stability when used in the range of 0.001 to 2%. To prepare a liquid formulation,

23

natalizumab was concentrated to 65 mg/mL in 10 mM sodium phosphate, 140 mM sodium chloride, pH 6, with about 0.06% polysorbate 80. The resulting solution was slightly opalescent but without particulates. The sample contained greater than 99% monomer with no high molecular weight aggregate or low molecular weight species by SEC.

5 A stable lyophilized pharmaceutical formulation is provided. Because phosphate buffer undergoes a pH change during freezing, it is necessary to replace the phosphate with a different buffer. This buffer may be comprised of histidine, citrate or succinate, with the ability to buffer effectively in the pH range of 3.0 to 7.0, most preferably in the range of 6.0 +/- 0.5.

10 The use of polyols (such as mannitol) and sugars (such as sucrose) are necessary to provide cryo- and lyo-protection. These polyols may be used alone or in a combination to provide for stability and adjustment of the tonicity. Additionally, the use of amino acids (such as glycine), at levels of 10-1000 mM may be used to prevent aggregation.

15 Surfactants, such as polysorbates or poloxamers, may be used at levels from 0.001% to 2.0% to provide for stability before lyophilization and after reconstitution and to provide for more rapid reconstitution times.

20 The protein, following the final purification step, may be formulated using ultrafiltration for concentration and diafiltration for buffer exchange. The protein may also be formulated using column chromatography for buffer exchange. Some combination of these techniques may also be used.

 In addition, the final desired protein concentration may be obtained by filling at a protein and excipient concentration lower than desired and reconstitution at a smaller volume. For example, a 2.5 mL fill volume of a 40 mg/mL solution may be used, followed by reconstitution with 1 mL to obtain a 100 mg/mL solution.

25 For example, natalizumab, at a concentration of 20 mg/mL, was lyophilized in a solution containing 5 mM histidine, 20 mg/mL sucrose and 0.02% polysorbate 80, pH 6. The solution was filled at 5mL per vial into 10 mL borosilicate glass vials and fitted with gray butyl rubber lyophilization stoppers. Lyophilization was done using a Virtis Gensis model lyophilizer. The product was frozen at a shelf temperature of -60° C for 10 hours and then
30 the shelf temperature was raised to -40°. Primary drying was performed at a shelf temperature of -10° C and a chamber pressure of 100 mTorr for 20 hours. Secondary drying

15

was achieved at a shelf temperature of 25°C with a chamber pressure of 100 mTorr for 10 hours. The vials were stoppered under vacuum.

The vials were then reconstituted using 1 mL of sterile WFI to give a formulation containing 100 mg/mL natalizumab. The samples were analyzed immediately after
5 lyophilization and after 2 wks of storage in the lyophilized form at 40 deg. In both cases reconstitution times were immediate. The reconstituted solutions were clear and colorless with an absence of particulate material. The samples contained greater than 99% monomer by SEC, with no high molecular weight aggregate, or low molecular weight species. After 2 weeks storage at 40 deg, the sample showed 94% potency relative to reference (specification
10 80-125%).

All cited patents and publications referred to in this application are herein incorporated by reference in their entirety for all purposes.

23

Claims:

We claim:

1. A stable, aqueous pharmaceutical formulation comprising an immunoglobulin, a phosphate buffer, a polysorbate, and sodium chloride.
2. The formulation of claim 1, wherein the polysorbate is polysorbate 80.
3. The formulation of claim 2, wherein the polysorbate 80 is present in an amount of about 0.001% to about 2.0% (w/v).
4. The formulation of claim 3, wherein the polysorbate 80 is present in the amount of about 0.02% (w/v).
5. The formulation of claim 1, wherein the immunoglobulin is present in the amount of about 0.1 mg/mL to about 200 mg/mL.
6. The formulation of claim 5, wherein the immunoglobulin is present in the amount of about 1.7 mg/mL.
7. The formulation of claim 5, wherein the immunoglobulin is present in the amount of about 5 mg/mL.
8. The formulation of claim 5, wherein the immunoglobulin is present in the amount of about 20 mg/mL.
9. The formulation of any one of claims 1 to 8, wherein the formulation has a pH of about 3.0 to about 7.0.
10. The formulation of claim 9, wherein the pH is about 5.5 to about 6.5.
11. The formulation of claim 10, wherein the pH is about 6.0 ± 0.5 .

12. The formulation of claim 1, wherein the formulation is in a fixed volume and the immunoglobulin is present in the amount of about 50 mg/mL.
13. The formulation of claim 12, wherein the immunoglobulin binds alpha-4 integrin.
14. The formulation of claim 13, wherein the immunoglobulin is natalizumab.
15. The formulation of claim 1, wherein the phosphate buffer is at pH 6.0 ± 0.5 , the polysorbate is polysorbate 80 and is present in an amount of about 0.02% (w/v), the immunoglobulin is natalizumab, and wherein the formulation is stable at a temperature of about 2°C to about 8°C for at least 6 months.
16. The formulation of claim 15, wherein natalizumab is present in an amount of about 20 mg/mL to about 150 mg/mL.
17. The formulation of claim 1, wherein the formulation is isotonic.
18. The formulation of any one of claims 1-14 or 17, wherein the immunoglobulin is a monoclonal antibody.
19. The formulation of claim 18, wherein the monoclonal antibody is natalizumab.
20. The formulation of claim 18-19, wherein the antibody is present in an amount of about 0.1 mg/mL to about 200 mg/mL.
21. The formulation of claim 19, wherein the antibody is present in an amount of about 1 mg/mL to about 150 mg/mL.
22. The formulation of claim 21, wherein the antibody is present in an amount of about 1.7 mg/mL or about 50 mg/mL.

25

23. The formulation of claim 18, wherein the antibody is present in the amount of about 15 mg/mL to about 50 mg/mL.

24. The formulation of claim 18, wherein the antibody is present in the amount of about 20 mg/mL.

25. The formulation of claim 1, wherein the formulation further comprises histidine.

26. The formulation of claim 25, wherein the polysorbate is polysorbate 80.

27. A method of treating a patient with variable weight for a condition with a therapeutic amount of an immunoglobulin comprising administering a formulation of claim 1 to said patient wherein the condition is treated by administration of the formulation.

28. The method of claim 27, wherein the immunoglobulin is natalizumab.

29. A composition comprising a sodium phosphate, a polysorbate, a protein and NaCl with a pH of 6.0 ± 0.5 , wherein the composition is stable when stored at about 5°C to about 8°C for greater than 6 months.

30. The composition of claim 29, wherein the polysorbate is polysorbate 80 and is present in an amount of about 0.001% to about 2.0% (w/v).

31. The composition of claim 29, wherein the protein is an immunoglobulin which is present in an amount of about 0.01 mg/mL to about 200 mg/mL.

32. The composition of claim 29, wherein the polysorbate is polysorbate 80 and is present in the amount of about 0.02% (w/v), the NaCl is present in the amount of 150 mM, the phosphate buffer is present in the amount of 10 mM, and the immunoglobulin is natalizumab and is present in the amount of 1.7 mg/mL, 5 mg/mL, 20 mg/mL or 50 mg/mL.

25

33. A method of preparing a stable protein containing formulation comprising admixing sodium phosphate, sodium chloride, a polysorbate and a protein and adjusting the pH of the mixture with phosphoric acid to about pH 6.0 ± 0.5 .

34. The method of preparing a stable protein containing formulation of claim 33, wherein the sodium phosphate is present in an amount of about 10 mM, the sodium chloride is present in an amount of about 150 mM, the polysorbate is polysorbate 80 and is present in an amount of about 0.02% (w/v) and the protein is natalizumab.

35. The method of preparing a stable protein containing formulation of claim 33, wherein natalizumab is present in an amount of about 20 mg/mL to about 200 mg/mL.

36. The method of preparing a stable protein containing formulation of claim 35, wherein natalizumab is present in an amount of about 150 mg/mL.

37. The method of preparing a stable protein containing formulation of claim 33, wherein the protein is lyophilized in the formulation of claim 1.

38. The method of preparing a stable protein containing formulation of claim 37, wherein the polysorbate is polysorbate 80 and is present in an amount of about 0.02% (w/v) and the protein is natalizumab.

39. The method of preparing a stable protein containing formulation of claim 37, wherein the formulation further comprises histidine.

40. The method of preparing a stable protein containing formulation of claim 33, wherein the protein is lyophilized in a solution comprising 5 mM histidine, 20 mg/mL sucrose and 0.02% polysorbate 80 at a pH 6, and wherein the protein is natalizumab at a concentration of 20 mg/mL.

41. An article of manufacture comprising a container holding the stable formulation of any one of claims 1-29.

25

42. A method for treating a patient with variable weight for a condition, comprising simultaneously or sequentially administering to the patient a therapeutically effective combination of a formulation of any one of claims 1-24 and a compound or therapy effective against the condition.

43. The use of the stable formulation of any one of claims 1-24 for the preparation of a medicament for the treatment of a condition in a patient with a variable weight condition wherein the medicament is effective to treat said condition.

44. The use of the stable formulation of any one of claims 1-24 for the preparation of a medicament to treat a condition in a patient with a variable weight condition, wherein the medicament is a combination of a formulation of any one of claims 1-24 and a compound or therapy, and wherein said medicament is effective to treat the condition.

FORMULACIÓN DE INMUNOGLOBULINA Y MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA MISMA.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se dirige a formulaciones concentradas estables de proteínas o anticuerpos, tales como natalizumab, en las cuales la actividad del anticuerpo es retenida y también puede ser administrada en un pequeño volumen y puede ser administrado a un sujeto de peso variable que necesite el mismo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION.

Las formulaciones de anticuerpo y proteína son conocidas en la técnica. No obstante, la preparación de formulaciones de proteína, tales como formulaciones de anticuerpos, que sean químicamente y biológicamente estables, está llena de desafíos. También resulta problemática la preparación de formulaciones que no solamente sean estables sino que además puedan mantener un volumen pequeño (es decir, permiten una inyección de volumen pequeño) aún con una concentración acrecentada de proteína, tal como un anticuerpo. Existe una necesidad de tales formulaciones. Por ejemplo, las cantidades concentradas de proteína en un volumen fijo que también es estable serían especialmente beneficiosos para pacientes de peso variable. La administración de fluidos a pacientes de peso variable puede, por ejemplo, tener una reacción adversa.

El desarrollo de tales formulaciones se ha visto obstaculizado por las mismas proteínas o anticuerpos, los cuales tienen una alta tendencia a agregarse y precipitarse.

RESUMEN DE LA INVENCION.

Por lo tanto, a pesar de lo que se ha informado anteriormente en la literatura, existe una necesidad de mejores métodos de formular proteínas

y/o anticuerpos. También existe la necesidad de formulaciones estables con grandes concentraciones de anticuerpo o proteína, donde se retiene la actividad del anticuerpo o la proteína. Asimismo existe la necesidad de formulaciones estables de proteína concentrada que mantengan un volumen fijo. Los solicitantes revelan composiciones estables las cuales pueden ser utilizadas además para preparar formulaciones de anticuerpos, especialmente formulaciones con altas concentraciones de anticuerpos las cuales no se precipitan y son estables cuando se almacenan a las temperaturas recomendadas. Las formulaciones de anticuerpos estables y altamente concentradas ayudarán ampliamente a cualquier médico en el tratamiento de sujetos de peso variable.

Un aspecto de la invención ofrece una formulación farmacéutica acuosa estable, la cual comprende una inmunoglobulina (u otra proteína), un tampón fosfato, un polisorbato, y cloruro de sodio. Preferentemente el polisorbato es polisorbato 80, y preferentemente en la cantidad de alrededor de 0.001 % a alrededor de 0.02% (p/v). Más preferentemente el polisorbato se encuentra presente en la cantidad de 0.02%. En otra realización, la inmunoglobulina u otra proteína se encuentra presente en la formulación en una cantidad de alrededor de 0.1 mg/mL hasta alrededor de 200 mg/mL . Preferentemente la formulación es regulada hasta un pH entre alrededor de 3.0 y alrededor de 7.0 y más preferentemente se regula alrededor de 6.0 $\pm$ 0.5. La formulación es preferentemente isotónica. La formulación puede asimismo comprender histidina. Preferentemente, la histidina es L-histidina. En otro aspecto de la invención, la inmunoglobulina de la formulación anteriormente citada es un anticuerpo integrina anti-alfa-4, tal como el natalizumab u otro anticuerpo humanizado o monoclonal. Este anticuerpo puede encontrarse presente en la cantidad estándar o en una cantidad

concentrada, por ejemplo, alrededor de 15 mg/mL o más. Preferentemente, el natalizumab se encuentra presente en una cantidad desde alrededor de 20mg/mL hasta alrededor de 150 mg/mL. En instancias en las cuales la formulación se encuentra presente en una concentración de alrededor 15mg/mL o más, esta formulación se mantiene en un volumen fijo, de por ejemplo, alrededor de 125 mL .

Asimismo es objeto de esta invención proporcionar un método de tratar al paciente con peso variable por una condición con una cantidad terapéutica de una inmunoglobulina que comprende la administración de una formulación según se describe y menciona en el presente, donde la condición es tratada mediante la administración de la formulación. Otro aspecto de la invención es que la condición sea mediada por la integrina alfa-4, y en tales condiciones que la inmunoglobulina reconozca y se fije a la integrina alfa-4, tal como el natalizumab.

Otro aspecto de la invención ofrece una composición que comprende fosfato de sodio, un polisorbato, una proteína y NaCl con un pH de 6.0 $\pm$ 0.5, en el cual la composición es estable cuando se almacena a una temperatura de 5EC hasta una temperatura de 8EC durante un período de tiempo prolongado.

Otro aspecto de la invención ofrece un método de preparar una proteína estable que contiene la formulación que comprende la mezcla de fosfato de sodio, cloruro de sodio, un polisorbato y una proteína y el ajuste del pH de la mezcla con ácido fosfórico hasta alrededor de un pH de 6.0 $\pm$ 0.5.

La proteína puede ser liofilizada en la formulación de la presente invención. El polisorbato es preferentemente polisorbato 80k, presente en una cantidad de alrededor 0.02% (p/v), y la proteína es preferentemente natalizumab. La formulación puede asimismo comprender histidina.

Preferentemente, la proteína es liofilizada en una solución que comprende histidina de 5Mm, sacarosa de 20mg/mL y 0.02% de polisorbato 80 a un pH 6, y la proteína es natalizumab en una concentración de 20 mg/mL .

Otro objeto de la invención es ofrecer un artículo de elaboración que comprende un contenedor que contiene la formulación estable descrita y mencionada en el presente.

Otro aspecto de la invención ofrece un método para tratar al paciente con peso variable por una condición, que comprende la administración simultánea o secuencial al paciente de una combinación terapéuticamente eficaz de la formulación descrita y mencionada en el presente y un compuesto o terapia eficaz contra la condición.

Otro aspecto de la invención es ofrecer un uso de cualesquiera de las formulaciones estables descritas en el presente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una condición en la cual el medicamento es eficaz para tratar dicha condición. Este medicamento asimismo puede comprender un segundo compuesto o terapia para tratar la condición.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

1. Definiciones

“Proteína” incluye sin limitarse a, las inmunoglobulinas, enzimas, receptores, y fragmentos de los mismos. Aunque el estudio de la formulación se ofrece principalmente en referencia a un anticuerpo o inmunoglobulina, otras proteínas son contempladas como intercambiables en la formulación revelada.

“Inmunoglobulina” incluye sin limitarse a un anticuerpo y fragmento de anticuerpo (tales como scFv, Fab, Fc, F(ab')₂), y otras porciones de

anticuerpos genéticamente dirigidas. Dependiendo de la secuencia del aminoácido del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a clases diferentes. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Asimismo muchas de estas pueden ser divididas en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4; IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas son llamados alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gama(γ) , y mu (μ), respectivamente. Las estructuras de sub-unidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Preferentemente, la inmunoglobulina reconoce y se une a la integrina alfa-4.

El término “anticuerpo” es empleado en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos agonistas y antagonistas), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitépica, y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, scFv y Fv), en tanto muestren la actividad biológica deseada. “Anticuerpo” incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados y otros anticuerpos producidos por medio de ingeniería genética.

El término “anticuerpo monoclonal” según se emplea en el presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por posibles mutaciones que ocurran naturalmente las cuales puedan estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, siendo dirigidos contra un sitio antígeno único. Asimismo, en contraste con las

preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), las cuales típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un determinante único sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que son sintetizados por sistemas de expresión de células de mamíferos o tecnología transgénica, no contaminada por otras inmunoglobulinas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser empleados según la presente invención pueden ser expresados en cabras, según describen Behboodi, et al. (2002) *Transgenic cloned goats and the production of therapeutic proteins*. En *Principles of Cloning*. Elsevier Science (EUA); y Meade et al.(1999) *Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals* en *Gene expression systems: using nature for the art of expression*. J.M Fernández y J.P. Hoeffler ed., Academic Press. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo, obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no se interpretará como requerimiento la producción de anticuerpos por método particular alguno. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser empleados de acuerdo con la presente invención pueden ser realizados por los métodos descritos por Shepherd et al., *Monoclonal antibodies: A practical approach* (Oxford University Press, 2000).

El término “anticuerpos monoclonales” asimismo incluye anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los cuales una porción de cadena pesada y/o liviana es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes en

anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, en la medida en que muestren la actividad biológica deseada. Por ejemplo, la habilidad de unirse a la integrina alfa-4. Los “anticuerpos monoclonales” asimismo pueden ser aislados de bibliotecas de anticuerpos en fagos empleando las técnicas descritas por ejemplo en Clackson et al., 1991 *Nature* 352:624-628 y Marks et al., 1991 *J. Mol Biol.*, 222:581-597. Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murina, de conejo, bovino, equino, porcino, y similares) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen al antígeno), los cuales contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no-humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor son reemplazados por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata o conejo que posea la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunas instancias, los residuos (de la estructura Fv) de la inmunoglobulina humana son reemplazados por los residuos no-humanos correspondientes. Asimismo, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o en las secuencias de la estructura. Estas modificaciones son realizadas para refinar más y optimizar mejor la actuación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a aquellas de la inmunoglobulina no-

humana y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son aquellas de la secuencia de consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de la inmunoglobulina humana.

La expresión "anticuerpos lineales" está también incluida en el término general "anticuerpo" y son un par de segmentos Fd en tandem (VH.CH1-VH-CH1), los cuales forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser bi-específicos o monoespecíficos.

Un "anticuerpo variante" (también incluido por el término genérico "anticuerpo") es una molécula que difiere en su secuencia de aminoácido de una secuencia de aminoácido de un anticuerpo "padre" por la adición, eliminación y/o sustitución de uno o más residuo(s) de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo padre. En una realización preferida, la variante comprende una o más sustitución(es) de aminoácidos en una o más región(es) hipervariables del anticuerpo padre. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos una sustitución, por ejemplo, desde alrededor de una a alrededor de diez, y preferentemente desde alrededor de dos a alrededor de cinco, en una o más regiones hipervariables del anticuerpo padre. Comúnmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácido con al menos un 75% de identidad de secuencia de aminoácido con las secuencias de dominio de la variable de cadena pesada o liviana del anticuerpo padre, más preferentemente al menos 80%, más preferentemente al menos 85%, más preferentemente al menos 90%, y más preferentemente al menos 95%. Identidad u homología con respecto a esta secuencia es definido en el presente según el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos del anticuerpo padre, luego de

alinearse las secuencias e introducir los intervalos, si es necesario, con el fin de lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las secuencias N-terminal, C-terminal, o extensiones internas, supresiones, o inserciones en la secuencia del anticuerpo deberían ser interpretadas como afectando la identidad u homología de la secuencia.

Con el fin de analizar tales propiedades, se debería comparar una forma Fab de la variante con una forma Fab del anticuerpo padre o una forma de extensión completa de la variante con una forma de extensión completa del anticuerpo padre, por ejemplo, desde que se ha encontrado que el formato del anticuerpo impacta la actividad del mismo en los ensayos de actividad biológica que se revelan en el presente. El anticuerpo variante de interés particular es uno que presenta al menos 10 veces, preferentemente al menos alrededor de 20 veces, y más preferentemente al menos 50 veces, acrecentamiento en la actividad biológica cuando se compara con el anticuerpo padre. El anticuerpo "padre" es aquel que se encuentra codificado por una secuencia de aminoácidos empleada en la preparación de la variante. Preferentemente, el anticuerpo padre tiene una región de estructura humana y tiene region(es) constantes de anticuerpos humanos. Por ejemplo, el anticuerpo padre puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

Un "anticuerpo aislado" es aquel que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio ambiente natural. Los componentes contaminantes de su medio ambiente natural son materiales, que interferirían con empleos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otras soluciones proteínicas o no proteínicas. En realizaciones preferidas, el anticuerpo será purificado(1) en más del 95% por el peso del anticuerpo según determina el método

Lowry, y más preferentemente en más de un 99% por peso, (2) a un grado suficiente para obtener el menos 15 residuos de N-terminal o secuencia interna de aminoácidos por el empleo de un ssecuenciador centrífugo, o (3) con el fin de homogeneizar por SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o no reducción empleando Coomassie azul o, preferentemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de las células recombinantes desde que al menos un componente del medio ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Comúnmente, no obstante, el anticuerpo aislado será preparado por al menos un paso de purificación.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de los fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(AB')₂, y fragmentos de Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpo de “cadena simple Fv” o “sFv” comprenden los dominios de anticuerpos VH y VL, en los cuales estos dominios están presentes en una cadena única de polipéptidos. Generalmente, el polipéptido Fv asimismo comprende un polipéptido de enlace entre los dominios VH y VH el cual permite al sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno.

El término “diacuerpos” hace referencia a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptidos (VH-VL). Al emplear un enlace que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios

son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. La vía de administración del anticuerpo es acorde a métodos conocidos y son bien conocidos, y pueden incluir, por ejemplo, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, o intralesional, o por sistemas de liberación sostenida. El anticuerpo puede ser administrado continuamente por infusión o por inyección en bolo. Las composiciones terapéuticas de anticuerpos generalmente son ubicadas en un recipiente que posee un puerto estéril de acceso, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa vial que posee un tapón que puede ser perforado por una aguja inyectable hipodérmica. Los excipientes "farmacéuticamente aceptables" (por ejemplo, vehículos, aditivos) son aquellos que pueden ser administrados razonablemente a un sujeto mamífero con el fin de proporcionar una dosis efectiva de ingrediente activo empleado. Una formulación "estable" es aquella en la que la proteína de la misma esencialmente retiene su estabilidad física y/o la estabilidad química y/o la actividad biológica luego de ser almacenada. Por "estable" también se entiende una formulación que muestra pocos o ningún signo de inestabilidad, incluyendo la agregación y/o desamidación. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención pueden permanecer estables durante al menos dos años, cuando se almacenan según se indica a la temperatura de 5-8°C.

Varias técnicas analíticas para la medición de la estabilidad de la proteína están disponibles en la técnica y son reseñadas en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301 (Vincent Lee ed., New York, N.Y., 1991) y Jones, 1993 *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90, por ejemplo.

La estabilidad puede ser medida a una temperatura seleccionada durante un tiempo seleccionado según se ejemplifica en los ejemplos proporcionados. El almacenamiento de formulaciones estables si es preferentemente durante al menos 6 meses, más preferentemente 12 meses, más preferentemente 12-18 meses, y más preferentemente durante 2 o más años.

Una proteína, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, "retiene su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no muestra signos de agregación, precipitación, desamidación y/o desnaturalización luego de la inspección visual del color y/o claridad, o según fue medido por la luz dispersa UV o por cromatografía de exclusión por tamaño.

Una proteína "retiene su estabilidad química" en una formulación farmacéutica si la estabilidad química a un tiempo dado es tal que la proteína se considera que aún retiene su actividad biológica. La estabilidad química puede ser evaluada al detectar y cuantificar formas de la proteína químicamente alteradas. La alteración química puede implicar la modificación del tamaño (por ejemplo, por recorte), la cual puede ser evaluada empleando la cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o ionización de desorción de laser asistida por matriz/espectrometría de masa de tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen la alteración de la carga (por ejemplo, que ocurren como resultado de la desamidación), los cuales pueden ser evaluados por cromatografía de intercambio de iones, por ejemplo. Un anticuerpo "retiene su actividad biológica" en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado se encuentra dentro de alrededor del 10% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica mostrada en el momento que la formulación

farmacéutica fue preparada según se determinó en el ensayo de unión al antígeno, por ejemplo.

Por “isotónico” se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica desde alrededor de 250 a 350 mOsm. La isotonicidad puede ser medida empleando un osmómetro del tipo de presión de vapor o de punto de congelación, por ejemplo.

Según se emplea en el presente, “tampón” se refiere a una solución tamponada que resiste los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados de base ácida. El tampón de la presente invención tiene un pH en el margen de alrededor de 3.0 a alrededor de 7.5; preferentemente desde alrededor de un pH de 4.0 a alrededor de 7.0; más preferentemente desde alrededor de un pH de 5.0 a alrededor de 6.5; más preferentemente desde alrededor de un pH de 5.0 a alrededor de 6.0 $\pm$ 0.5. también se contempla un pH de cualquier punto intermedio entre los márgenes antes mencionados.

En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente invención, una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un anticuerpo se refiere a la cantidad eficaz en la prevención o tratamiento de un desorden para el tratamiento del cual el anticuerpo es eficaz. Un “desorden” es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo a la proteína. Incluye desórdenes crónicos y agudos o enfermedades que incluyen aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al desorden en cuestión.

“Tratamiento” hace referencia a tanto el tratamiento terapéutico como al profiláctico o las medidas preventivas. Aquellos que necesitan el

tratamiento incluye a aquellos que ya poseen el desorden así como aquellos en los cuales el desorden se ha de prevenir.

Un “preservante” es un compuesto que puede ser incluido en la formulación esencialmente con el fin de reducir la acción bacterial en el mismo, de ese modo facilita la producción de una formulación multiuso, por ejemplo. Los ejemplos de preservantes potenciales incluyen cloruro de amonio octadecilodimetilobencilo, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilobencilodimetiloamonio en los cuales los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de benzetonio. Otros tipos de preservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como el fenol, alcohol de butilo y bencilo, parabenos alquilo tales como el parabeno metilo o propilo, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol.

Por “paciente” o “sujeto” se intenta incluir a cualquier mamífero. Un “mamífero”, para los propósitos del tratamiento, hace referencia a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo pero sin limitarse a, los humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, de deporte, o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, y similares. Preferentemente, el mamífero es un humano.

Por “Antegren 7” se intenta incluir el anticuerpo también conocido como AN100226 (número de código del anticuerpo) o natalizumab (nombre USAN). Natalizumab es un anticuerpo integrina anti-alfa-4 humanizado recombinante. Preferentemente, la enfermedad o condición que se está tratando en el mamífero es aquella que se modula cuando se administra una dosis terapéuticamente eficaz de natalizumab.

Por “estable” se hace referencia a una formulación que muestra pocos o ningún signo de inestabilidad, incluyendo la agregación y/o desamidación. Asimismo, “estable” puede referirse también a una formulación que no

5

muestra signo alguno de inestabilidad mayor o igual a dos años, cuando se almacena según se indica en

2. Descripción General

En el estudio anterior y los ejemplos que siguen a continuación, se revelan formulaciones para formulaciones estables de anticuerpos. Determinadas formulaciones estables reveladas tienen altas concentraciones de anticuerpos pero mantienen un volumen fijo, donde los anticuerpos en estas

formulaciones son estables y el anticuerpo no precipita fuera de la solución ni agrega. Otras proteínas además de los anticuerpos también son contempladas para las formulaciones de alta concentración.

Los anticuerpos son típicamente administrados a un sujeto (por ejemplo, un humano) a una concentración de alrededor de 0.01 mg/mL hasta alrededor de 200 mg/mL. Más típicamente, los anticuerpos oscilan en la concentración entre alrededor de 0.1 mg/mL y alrededor de 150 mg/mL. No obstante, existen instancias en las que se requieren concentraciones mayores para ser administradas al paciente, por ejemplo, alrededor de 15 a alrededor de 200 mg/mL, más preferentemente alrededor de 15 mg/mL hasta 150 mg/mL, más preferentemente alrededor de 20 a alrededor de 50 mg/mL y cualquier valor entero entre medio.

La formulación de anticuerpo puede ser administrada a un mamífero que necesite el tratamiento con la proteína, de acuerdo con los métodos conocidos. Estos métodos pueden incluir, pero no se limitan a la administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. En realizaciones preferidas, la formulación de anticuerpo es administrada al mamífero por administración intravenosa.

La dosis apropiada de la proteína dependerá, por ejemplo, de la condición a ser tratada, la intensidad, y el curso de la condición, si la proteína es administrada con fines de prevención o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica y la respuesta del paciente a la proteína, el tipo de proteína empleada, y la discreción del médico tratante. La proteína es administrada adecuadamente al paciente una vez o durante una serie de tratamientos y puede ser administrada en cualquier momento desde el diagnóstico en

adelante. La proteína puede ser administrada como único tratamiento o en conjunto con otras drogas o terapias útiles en el tratamiento de la condición en cuestión. Según se emplea en el presente, se dice que dos (o más) agentes son administrados en combinación cuando los dos agentes se administran simultáneamente o son administrados en forma independiente de forma tal que los agentes actuarán contemporáneamente.

Al poner los métodos de la presente invención en práctica, los compuestos de esta invención pueden ser empleados solos o en combinación, o en combinación con otros agentes terapéuticos. En determinadas realizaciones preferidas, los compuestos de esta invención pueden ser co-administrados junto con otros compuestos típicamente recetados para estas condiciones según la práctica médica generalmente aceptada. Por ejemplo, las formulaciones de esta invención pueden ser administradas en combinación con otros agentes terapéuticos o terapias físicas para el tratamiento de artritis reumatoide, esclerosis múltiple y la enfermedad de Crohn.

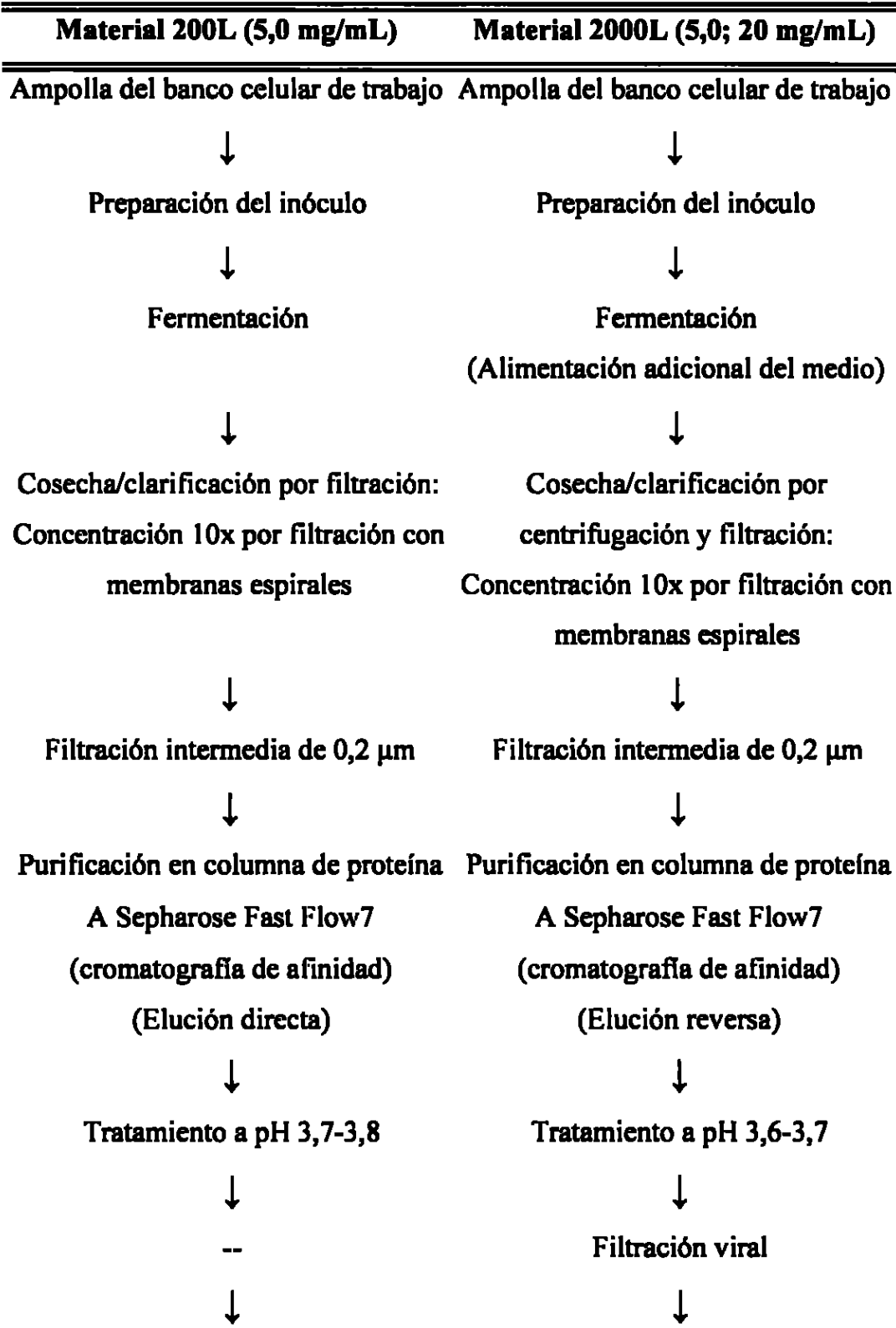
2.1 Método para preparar la formulación de anticuerpo

Tal como podrán observar los expertos en la técnica, el proceso se puede modificar, pero en líneas generales seguirá un procedimiento tal como el siguiente. Obtener una ampolla de un banco celular de trabajo que contenga células que fabriquen el anticuerpo o la proteína de interés. Preparar el

inóculo. Cultivar o fermentar las células con alimentaciones adicionales si fuera necesario. Cosechar/clarificar las células por centrifugación y/o filtración. Esto se puede realizar, por ejemplo, concentrando las células 10 veces mediante filtración con membranas espirales. Realizar una filtración intermedia de 0,2 Φ m, seguida de purificación en columna de proteína A Sepharose Fast Flow7 (es decir, cromatografía de afinidad) y elución reversa. Luego la composición que contiene el anticuerpo recibe un tratamiento a un pH comprendido entre 3,6 y 3,7. A continuación la mezcla se somete a una filtración viral seguida de una etapa de concentración/diafiltración. Luego la composición se puede purificar mediante cromatografía en DEAE Sepharose Fast Flow7 (intercambio aniónico). Este paso se puede realizar múltiples veces. A continuación la composición se concentra aún más y luego se somete a purificación usando el sistema Sephacryl S300HR7 (es decir, cromatografía de filtración en gel), para lo cual el tampón utilizado es fosfato/NaCl. Si se desea, la composición que contiene el anticuerpo se puede concentrar aún más para las formulaciones de mayor concentración (por ejemplo, 20 mg/mL o más). Luego la composición que contiene el anticuerpo se tampona y se ajusta la concentración agregando 0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80. Esta composición se somete a una filtración final utilizando un filtro de 0,2 Φ m. y luego se puede dispensar en botellas de polipropileno de 100 mL a 10L de capacidad. El anticuerpo o la inmunoglobulina así obtenido se puede someter a pruebas de control de calidad (QC) y aseguramiento de la calidad (QA) antes de liberarlo.

El procedimiento arriba descrito se puede realizar, por ejemplo para el natalizumab, de acuerdo con el siguiente diagrama:

3



2

Material 200L (5,0 mg/mL)	Material 2000L (5,0; 20 mg/mL)
Concentración/Diafiltración	Concentración/Diafiltración
↓	↓
Purificación mediante cromatografía en DEAE Sepharose Fast Flow7 (Cromatografía de intercambio aniónico) (Un solo ciclo)	Purificación mediante cromatografía en DEAE Sepharose Fast Flow7 (Cromatografía de intercambio aniónico) (Múltiples ciclos)
↓	↓
Concentración	Concentración
↓	↓
Purificación con Sephacryl S300HR7 (Cromatografía de filtración en gel) (Tampón: histidina/NaCl)	Purificación con Sephacryl S300HR7 (Cromatografía de filtración en gel) (Tampón: fosfato/NaCl)
↓	↓
--	(Concentración adicional para 20 mg/mL)
↓	↓
Tampón y ajuste de la concentración con fosfato/NaCl; 0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80	Tampón y ajuste de la concentración (añadir 0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80
↓	↓
Filtración final de 0,2 µm y dispensado (botellas de	Filtración final de 0,2 µm y dispensado (botellas de

57

Material 200L (5,0 mg/mL)	Material 2000L (5,0; 20 mg/mL)
polipropileno de 100 mL a 1 L)	polipropileno de 100 mL a 1 L)
↓	↓
Pruebas de control de calidad (QC) y aseguramiento de la calidad (QA) antes de liberar el AN100226 purificado a granel	Pruebas de control de calidad (QC) y aseguramiento de la calidad (QA) antes de liberar el AN100226 purificado a granel

2.2 **Formulación del anticuerpo**

En un aspecto de la invención se formula una inmunoglobulina en concentraciones de alrededor de 1,7; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0 ó 50,0 mg/mL en 10 mM de fosfato de sodio, 140 mM de NaCl (pH 6,0 ∓ 0,5) y 0,02% de polisorbato 80. Si fuera necesario el pH se ajusta a 6,0 ∓ 0,5 usando ácido fosfórico.

A continuación se presenta un ejemplo de las diferentes formulaciones.

COMPOSICIÓN CUANTITATIVA - FORMULACIÓN CON TAMPÓN FOSFATO

Componente	Función	Fórmula unitaria (por mL) 1,7 mg/mL	Fórmula unitaria (por mL) 5,0 mg/mL	Fórmula unitaria (por mL) 20 mg/mL
<u>Principio activo:</u>				
Anticuerpo monoclonal integrina anti-α4 humaniza	Activa	1,7 mg	5,0 mg	20 mg
<u>Otros ingredientes:</u>				

Componente	Función	Fórmula unitaria (por mL) 1,7 mg/mL	Fórmula unitaria (por mL) 5,0 mg/mL	Fórmula unitaria (por mL) 20 mg/mL
Fosfato de sodio, USP	Tampón y tonicidad	1,4 mg	1,4 mg	1,4 mg
Cloruro de sodio, USP	Tampón y tonicidad	8,2 mg	8,2 mg	8,2 mg
Ácido fosfórico, NF	Ajustar pH a 6,0 ∓ 0,5	Cantidad suficiente	Cantidad suficiente	Cantidad suficiente
Polisorbato 80, NF	Inhibir la agregación de las proteínas	0,2 mg	0,2 mg	0,2 mg
Agua para inyección, USP	Solvente	CS para 1 mL	CS para 1 mL	CS para 1 mL

Cualquiera de las formulaciones anteriores se envasan óptimamente en un envase aséptico. Estos envases pueden ser, por ejemplo, frascos de vidrio neutro Tipo I EP (por ejemplo, frascos de 5,0 ó 20 mL de capacidad de llenado) con tapones de goma de butilo gris Helvoet Pharma V9145/FM 157/1 con sellos de aluminio. Sin embargo, también se contemplan otros envases asépticos adecuados. Por ejemplo, las formulaciones se pueden envasar de la siguiente manera:

ENVASADO

Preparación de tampón fosfato/cloruro de sodio/polisorbato 80, si fuera necesario

↓

Esterilización de los frascos, tapones y equipos de fabricación



**Dilución del anticuerpo con tampón fosfato/cloruro de sodio/polisorbato 80
hasta 1,7 ó 50 mg/mL, según se requiera**



Filtración estéril



Llenado y taponado aséptico de los frascos

Colocación de tapas



Pruebas anteriores a la entrega

Más específicamente, el natalizumab obtenido por ejemplo mediante los procedimientos arriba discutidos, se puede envasar de la siguiente manera. Se puede envasar producto farmacéutico natalizumab 200L y 2000L usando una línea de llenado completamente automatizada equipada con un túnel de lavado, esterilización y despirogenización de los frascos. Los tapones, sellos y equipos de llenado se lavan y esterilizan antes de su utilización. Este proceso permite operaciones de llenado consistentes con los volúmenes producidos a partir de la fermentación de 2000 L.

Cuando resulte necesario, el tampón de la formulación, alrededor de 10 mM de fosfato, alrededor de 140 mM de NaCl, pH 6,0 $\pm$ 0,5, alrededor de 0,02% de polisorbato 80, se puede preparar en una sala Clase 10.000 y usar para diluir el producto farmacéutico a granel hasta obtener su concentración final. Preferentemente, las especificaciones para la concentración, el pH y la densidad durante el proceso se obtienen antes de la filtración.

El natalizumab u otra inmunoglobulina formulada se puede filtrar de forma estéril haciéndolo pasar a través de un filtro Millipak de 0,2 μm y recogiendo en un tanque de equilibrio de acero inoxidable dentro del núcleo estéril. El proceso de llenado, taponado y colocación de las tapas del natalizumab es totalmente automatizado. Durante el proceso se toman muestras para determinar la esterilidad del producto a granel; durante toda la operación de llenado se realizan verificaciones del peso de llenado y del espacio libre superior. El producto farmacéutico envasado se almacena en condiciones refrigeradas a una temperatura de aproximadamente 2 a 8EC.

El llenado se lleva a cabo dentro de un núcleo estéril Clase 100 totalmente validado. La línea de llenado se valida para proveer volúmenes de llenado dentro de las tolerancias anticipadas para los volúmenes de llenado de 5,0 mL y 2,0 mL. Durante toda la operación de llenado se realiza un monitoreo ambiental exhaustivo, y se revisa para verificar que este estándar se satisfaga de forma continua. Con una frecuencia trimestral se realizan validaciones del llenado aséptico ("media fills").

Alternativamente, el producto farmacéutico de 200 L producido se puede envasar de acuerdo con el siguiente ejemplo. Los frascos, las agujas de llenado, el equipo de filtración y las tuberías se preparan y esterilizan antes de su uso. Los tapones pueden ser preparados por el fabricante. Luego los tapones se esterilizan antes del llenado.

El producto farmacéutico que contiene natalizumab u otra proteína se envasa usando una línea de llenado semi-automática, con preparación de los componentes por lote, llenado automático, colocación inmediata de los tapones y colocación de las tapas en una operación posterior. Esta operación es adecuada para el caso de operaciones a escala de pequeños lotes.

Luego la solución final a granel se filtra de manera estéril haciéndola pasar a través de un filtro Millipak de 0,2 μm y recogiendo en un recipiente colector de vidrio estéril en un ambiente Clase 100. La calibración y las verificaciones frecuentes durante el proceso aseguran que la tolerancia de llenado se mantenga dentro de ∇ 2%. Los frascos se taponan e inmediatamente se les coloca la tapa. Preferentemente el producto farmacéutico envasado se almacena en condiciones refrigeradas a una temperatura de aproximadamente 2 a 8 EC.

El recipiente colector de vidrio puede ser de numerosos tipos diferentes, pero por ejemplo puede ser un frasco de vidrio neutro de 5,0 ó 20 mL de capacidad Tipo I (EP) provisto, por ejemplo, por Epsom Glass o AMILCO, o bien un frasco de vidrio de borosilicato de 5,0 ó 20 mL de capacidad USP Tipo I, provisto, por ejemplo, por Kimble o Wheaton. Para cerrar estos frascos se puede utilizar cualquier medio adecuado. Los medios para cerrar los frascos incluyen, pero no se limitan a, un tapón de goma de butilo gris de 13 mm Helvoet Pharma V9145/FM 157/1, un tapón de goma de butilo gris de 13 mm y 20 mm Helvoet Pharma V9145/FM 157/1 o un tapón de goma de butilo gris de 13 mm o 20 mm West 4432/50. Luego el frasco al cual ya se le ha colocado el tapón de goma se sella, más típicamente utilizando un sello de aluminio tal como el fabricado por West. Aunque la presente invención se ha descrito detalladamente con referencia a los ejemplos incluidos a continuación, se comprende que es posible introducir diferentes modificaciones sin apartarse del espíritu de la invención, y que estas modificaciones serán evidentes para los expertos en la técnica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Selección de polisorbato 80

La manera de administración típica del natalizumab es la intravenosa. La administración intravenosa exige que la formulación final sea isotónica. Inicialmente se seleccionó una formulación de AN100226 (natalizumab), 5 mg/mL en 50 mM de L-histidina, 150 mM de NaCl, pH 6,0 (Formulación #1). Durante un estudio de Fase II se observó precipitación de las proteínas del anticuerpo durante la dilución e introducción del natalizumab dentro del aparato de dosificación clínica. Se añadió polisorbato 80 a la formulación (Formulación #2) para solucionar la precipitación de proteínas observada. Preferentemente, el polisorbato a utilizar con la presente invención tiene bajo contenido de peróxido, es decir, polisorbato de Sigma, Producto Número P6479, Lote Número 071K7283.

Los dos factores que han demostrado acelerar la precipitación del anticuerpo AN100226 son la presencia de trazas de aceite de silicona y la desnaturalización en la interfase aire-líquido. El aceite de silicona se introdujo al producto al utilizar jeringas de polipropileno lubricadas estándares equipadas con émbolos de goma siliconada. La introducción de aceite de silicona es suficiente para provocar una precipitación perceptible del anticuerpo en la Formulación #1 al agitarla suavemente y almacenarla a temperatura ambiente. La agregación, desamidación y posterior precipitación provocadas por la desnaturalización en la interfase aire-líquido se vuelven problemas más perceptibles cuando el fármaco se envía a más sitios clínicos. Ambas causas de la precipitación de las proteínas se resolvieron añadiendo polisorbato 80 a una concentración de 0,02% (peso/volumen).

La Formulación #2 presenta una estabilidad comparable a la de la formulación que contiene histidina/NaCl (Formulación #1) en todos los

ensayos de caracterización de proteínas, a la vez que provee una mayor estabilidad durante el transporte y manipulación del producto en el ambiente clínico.

La adición de polisorbato 80 a la formulación también resuelve el problema de la precipitación o agregación del anticuerpo al preparar formulaciones con mayor contenido de proteínas. Los trabajos iniciales se concentraron en la agregación inducida por agitación para concentraciones elevadas de proteínas, incluyendo 50 mg/mL. Sometiendo el material a agitación mediante un mezclador de vórtice, se detectaron especies agregadas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con exclusión por tamaño (SEC-HPLC). Este modelo permitió identificar al polisorbato 80 como un inhibidor efectivo de la agregación, mientras que el efecto beneficioso de la sacarosa y otros componentes tampón fue escaso.

La efectividad de añadir 0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80 para prevenir la precipitación inducida por agitación para una concentración de proteínas de 5 mg/mL se evaluó luego de añadir 10 µL de una solución de polisorbato 80 al 10% a frascos de natalizumab (Lote No. AN100226-0003). Los frascos se agitaron sobre sus lados junto con varios frascos de natalizumab en la Formulación #1 a 150 rotaciones por minuto sobre un plano horizontal. Luego de tres horas de este tratamiento a temperatura ambiente, los frascos que contenían la Formulación #1 estaban llenos de partículas y tenían aspecto turbio, mientras que los frascos que contenían 0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80 permanecieron translúcidos y libres de partículas.

Se presume que la agregación observada es provocada por la interfase aire-superficie, ya que algunos frascos completamente llenos de AN100226 en

ausencia de polisorbato 80 se agitaron durante períodos de tiempo prolongados sin que se indujera formación de partículas adicionales.

Se llevó a cabo una evaluación de la capacidad del polisorbato 80 al 0,02% (peso/volumen) para inhibir la precipitación de proteínas facilitada por la presencia de trazas de silicona. Se reguló el contenido de un frasco de natalizumab (Lote No. AN100226-0003) hasta tener 0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80, y se extrajo en una jeringa de polipropileno de 60 mL lubricada disponible comercialmente. El material se dejó reposar durante varias horas a temperatura ambiente. Una inspección visual confirmó que no ocurría precipitación. Luego el material se filtró a través de un filtro de 0,2 µm recogiendo en un frasco de 5 mL y se lo inspeccionó, hallándose que luego de varios días estaba sustancialmente libre de partículas, mientras que los frascos tratados del mismo modo pero que no contenían polisorbato 80 (Formulación #1) estaban llenos de partículas.

Ejemplo 2

Selección del tampón fosfato

Durante las pruebas previas a la liberación del placebo de histidina (que contenía 0,02% peso/volumen de polisorbato 80), se detectaron nuevas trazas de impurezas. Estas impurezas surgieron de la degradación del polisorbato 80, aparentemente a través de una reacción de oxidación en que participaron iones metálicos y la histidina. En el caso del producto farmacéutico activo con natalizumab, estas trazas de impurezas sólo se detectaron luego de su almacenamiento a temperaturas elevadas (por ejemplo, 25EC y 40EC). Por lo tanto, se decidió modificar el placebo y utilizar fosfato para reemplazar la histidina en el tampón. El lote de histidina usado en el placebo fue diferente del usado para los lotes de producto farmacéutico activo con natalizumab AN100226-004 y

AN100226-005. El impacto de la fuente de histidina sobre la degradación del polisorbato 80 se discute más detalladamente en párrafos subsiguientes. Durante las pruebas del placebo, se detectaron trazas de impurezas en el placebo con histidina / NaCl / 0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80 (Formulación #2). Estas impurezas se detectaron por su absorbencia en la región ultravioleta de baja longitud de onda. Se determinaron los perfiles de absorbencia de 200 a 400 nm para placebo almacenado a 5EC, 25EC y 40EC durante un mes. Estos datos indican que las impurezas aumentan en función de la temperatura.

El método de cromatografía líquida de alta eficiencia con exclusión por tamaño utilizado para monitorear la agregación del anticuerpo se modificó para aumentar su sensibilidad para la detección de las trazas de impurezas, quintuplicando la carga de la columna hasta 100 µL, y la muestra se aplicó sin diluir en vez de diluida 10 veces. Además, la absorbencia se monitoreó a 260 nm para reflejar la absorbencia máxima de las impurezas. El método constituye una herramienta que permite evaluar la presencia de estas trazas de impurezas tanto en el placebo como en el producto, ya que el anticuerpo aparece de manera mucho más temprana en el perfil de elución.

El placebo y el producto farmacéutico final con natalizumab formulados en las Formulaciones #1 y #2 se analizaron mediante el método de cromatografía líquida de alta eficiencia con exclusión por tamaño (SEC-HPLC) descrito anteriormente. Inmediatamente antes de la cromatografía se realizó un análisis del placebo de la Formulación #1 al cual se le añadió polisorbato 80 hasta llegar a 0,02% (peso/volumen). Esto muestra la absorbencia UV del polisorbato 80, la histidina y la sal en ausencia de las trazas de impurezas. El pico ancho al cabo de 16 minutos se asocia con el polisorbato 80, mientras que los picos aproximadamente al cabo de 26-27

minutos se atribuyen a la histidina y la sal. El placebo con histidina/NaCl/ 0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80 (Formulación #2) almacenado a 5EC durante dos meses muestra un marcado aumento de los picos de elución tardía, lo cual involucra al polisorbato 80 en la producción de estas impurezas. Además, el eluido al cabo de 16 minutos desapareció, lo cual indica que el polisorbato 80 se ha degradado.

Se analizó AN100226 almacenado en forma de sustancia farmacéutica a granel durante aproximadamente cinco meses a 5EC en la Formulación #1 luego de añadir polisorbato 80 hasta llegar a 0,02% (peso/volumen), inmediatamente antes de la cromatografía. El anticuerpo se eluye al cabo de entre 16 y 18 minutos usando estas condiciones de sobrecarga. El resto del perfil se asemeja al del placebo con agregado de polisorbato 80. Las muestras con dos meses de estabilidad para el lote de natalizumab #AN100226-0004 también se analizaron mediante este método. El perfil de elución para la muestra de natalizumab a 5EC indica la ausencia de picos adicionales y niveles comparables de los picos de histidina/sal al cabo de 26-27 minutos. Las trazas de impurezas se detectan a los dos meses para la muestra a 25EC las, y hay niveles elevados presentes en la muestra mantenida a 40EC durante dos meses. Estas impurezas no fueron detectadas en los productos clínicos, los cuales se almacenan a 5EC. La aparición de estas trazas de impurezas es mucho más rápida en el placebo que en el natalizumab.

Para evitar la formación de estas impurezas en el placebo, en la formulación del placebo la histidina se reemplazó por componentes tampón inorgánicos. El placebo para las pruebas clínicas consiste en una solución isotónica estéril, tamponada con fosfato, formulada con 0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80 a pH 6,0. Se demostró que al reemplazar la histidina por

fosfato se reduce significativamente la velocidad de degradación del polisorbato 80. Se analizaron 100 µL de la formulación del placebo con fosfato/NaCl/0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con exclusión por tamaño monitoreada a 260 nm tanto en el tiempo cero como después de tres días a 60EC. Se observa poco cambio del perfil de la cromatografía líquida de alta eficiencia con exclusión por tamaño como resultado de esta incubación. El perfil de la cromatografía líquida de alta eficiencia con exclusión por tamaño correspondiente a la formulación con histidina/NaCl/0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80 luego de apenas dos días a 60EC muestra niveles significativos de trazas de impurezas relacionadas con la degradación del polisorbato 80. Estos datos demuestran que la degradación del polisorbato 80 se impide significativamente reemplazando la histidina por fosfato en la formulación del placebo.

Ejemplo 3

Formulación de natalizumab con una combinación de polisorbato 80 e histidina

Se cree que el mecanismo mediante el cual se producen estas trazas de impurezas es una oxidación del polisorbato catalizada por metales (ver Donbrow *et al.*, 1978 *J. Pharmaceutical Sciences*, 67(12): 28). Donbrow describe que diferentes tipos de polisorbatos sufren auto-oxidación durante su almacenamiento (por ejemplo, el polisorbato 20). La luz, las temperaturas y los iones metálicos también afectan la auto-oxidación. Donbrow *et al.* (1978). Se ha confirmado que es necesario que haya tanto histidina como polisorbato 80 para que esta reacción proceda a una velocidad significativa. Ajinomoto es el único proveedor de la histidina usada para las formulaciones. Sin embargo, se han observado diferencias

significativas en las velocidades de reacción entre los diferentes lotes suministrados por Ajinomoto.

Otro factor que desempeña un importante papel en la aceleración de la reacción es la presencia de un metal. Esto se demostró llevando a cabo una reacción a 60EC durante cinco días en un recipiente de vidrio con 50 mM de histidina (Lote No. R016A008) y 2% (peso/volumen) de polisorbato 80. Bajo estas condiciones, para este lote de histidina se producen niveles mínimos de trazas de impurezas. Luego la reacción se dividió en tres recipientes: (1) el primer recipiente se dejó para utilizar como control; (2) al segundo recipiente se le colocó un cierre (tapón) de butilo gris; y (3) al tercer recipiente se le agregó un aguja de acero inoxidable. Se permitió que estas reacciones continuaran durante cuatro días a 60EC y se las analizó mediante un barrido UV de 200 a 400 nm. Durante este lapso de tiempo el progreso de la reacción fue mayor en presencia de la aguja.

Ejemplo 4

Evaluación de las impurezas mediante prueba límite de dosis única en ratones

La potencial toxicidad de estas impurezas se evaluó mediante una prueba límite de dosis única en ratones. Se utilizaron muestras de placebo con histidina y natalizumab en la Formulación #2 almacenadas a 40EC durante seis semanas, ya que estas muestras contienen la mayor cantidad de impurezas. No hubo señales de toxicidad debida a las impurezas. La parte no clínica de la presentación contiene los datos preliminares.

Se determinaron los perfiles mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con exclusión por tamaño para inyecciones de 100 µL de muestras usadas en la prueba límite de dosis única en ratones. La muestra de natalizumab en la Formulación #1 a la cual se le agregó polisorbato 80

antes del análisis presenta poco material que absorbe a 260 nm eluido luego de 20 minutos. El pico de elución a los 34 minutos se halló en este lote de natalizumab sin adición de polisorbato 80, y por lo tanto no indica degradación del polisorbato 80. Por el contrario, el placebo en la Formulación #2 almacenado a 40EC durante seis semanas mostró una degradación completa, ya que el área total debajo de la curva fue de 12,8 millones de μVX segundos. La muestra con natalizumab en la Formulación #2 y almacenada a 40EC durante seis semanas tuvo menos degradación completa. El análisis confirma que las muestras almacenadas a 40EC y ensayadas en la prueba límite de dosis única en ratones están llenas de polisorbato 80 degradado.

Ejemplo 5

Establecer especificaciones para las impurezas

Para evaluar si el polisorbato 80 parcialmente degradado aún es capaz de impedir la agregación de los anticuerpos, se calentó Formulación #2 a 60EC durante tres días en presencia de una aguja para convertir todo el polisorbato 80 a los máximos niveles de impurezas. Se confirmó que la reacción había degradado todo el polisorbato 80 mediante cromatografía líquida de alta eficiencia tanto con exclusión por tamaño como de fase inversa. Este material se diluyó en una proporción de 1:1 con una solución de 10 mg/mL de AN100226 en la Formulación #2, obteniéndose una solución que contenía 0,01% (peso/volumen) de polisorbato 80 y 50% del máximo nivel de polisorbato 80 degradado. Estas soluciones de anticuerpo se sometieron tanto a agitación como a la presencia de jeringas siliconadas durante varias horas; se impidió la agregación de los anticuerpos. Las muestras de control expuestas a las mismas condiciones pero que no contenían polisorbato 80 evidenciaron una precipitación significativa.

De este trabajo se concluye que mientras que no se degrade más del cincuenta por ciento del polisorbato 80, este material puede proveer el ambiente adecuado para impedir la agregación de los anticuerpos.

Aunque en el producto farmacéutico activo ocurre muy poca degradación del polisorbato, se monitoreó el patrón de enfoque isoelectrico (IEF) para confirmar que esta formulación no compromete al anticuerpo. Se determinaron los perfiles del IEF para los puntos con seis semanas de estabilidad correspondientes a condiciones de almacenamiento a 5EC, 25EC y 40EC. Las muestras correspondientes a 5EC y 25EC son comparables al estándar de referencia, sin evidencia de cambios en la carga global de la proteína. La muestra correspondiente a 40EC mostró el movimiento hacia una especie más ácida típico de este producto en una formulación líquida ya sea en presencia o ausencia de polisorbato 80.

Para establecer una relación entre la extensión de la degradación del polisorbato 80 y el área pico de la cromatografía líquida de alta eficiencia con exclusión por tamaño, se evaluó una serie de dilución para seis concentraciones de polisorbato 80 degradado de 0 a 50%. Se calentó Formulación #2 a 60EC durante tres días con una aguja, y se confirmó que estaba 100% degradada mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con exclusión por tamaño y de fase inversa. Luego la mezcla de reacción se diluyó con AN100226 a granel purificado en la Formulación #1, al cual recién se había agregado 0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80, y se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con exclusión por tamaño. Los perfiles de exclusión se monitorearon a 260 nm.

Los datos de esta serie de dilución se graficaron de acuerdo con el área total de los picos integrada ($\mu\text{V}\times\text{segundos}$) para obtener el perfil de absorbencia luego de aproximadamente 24 minutos en función de la proporción de

polisorbato 80 degradado. Esta gráfica indica que un área de menos de 5 millones de μVX segundos representa una pérdida de alrededor de 50% de polisorbato a favor de los productos de degradación. Existe una relación directa entre la cantidad de polisorbato 80 oxidado añadido y el área de los picos para los picos de elución tardía en el cromatograma.

Se ha establecido un límite preliminar para estas trazas de impurezas en el natalizumab en base a la prueba límite de dosis única en ratones, los datos de solubilidad del anticuerpo con 50% de polisorbato 80 degradado, y estimaciones de la extensión de la degradación del polisorbato 80. El método ha sido incluido en el programa de estabilidad en curso y se ha establecido un límite. Si se fabrican lotes adicionales con tampón histidina, estos límites también se aplicarán en el momento de su liberación.

Límite: el área total debajo de los picos luego de aproximadamente 24 minutos no será mayor que $4 \times 10^6 \mu\text{VX}$ segundos.

Ejemplo 6

Formulación con 1,7 mg/mL de natalizumab

1,7 mg de natalizumab

1,4 mg de fosfato de sodio, USP

8,2 mg de cloruro de sodio, USP

0,2 mg de polisorbato 80, NF

Ajustar el pH a 6,0 ∇ 0,5 usando ácido fosfórico, NF. Cantidad suficiente para 1 mL. Preferentemente almacenar a una temperatura entre 5 y 8EC.

Ejemplo 7

Formulación con 5,0 mg/mL de natalizumab

5,0 mg de natalizumab

1,4 mg de fosfato de sodio, USP

8,2 mg de cloruro de sodio, USP

0,2 mg de polisorbato 80, NF

Ajustar el pH a 6,0 ∓ 0,5 usando ácido fosfórico, NF. Cantidad suficiente para 1 mL. Preferentemente almacenar a una temperatura entre 5 y 8EC.

Ejemplo 8

Formulación con 20,0 mg/mL de natalizumab

20,0 mg de natalizumab

1,4 mg de fosfato de sodio, USP

8,2 mg de cloruro de sodio, USP

0,2 mg de polisorbato 80, NF

Ajustar el pH a 6,0 ∓ 0,5 usando ácido fosfórico, NF. Cantidad suficiente para 1 mL. Preferentemente almacenar a una temperatura entre 5 y 8EC.

Ejemplo 9

Formulación con 50,0 mg/mL de natalizumab

50,0 mg de natalizumab

1,4 mg de fosfato de sodio, USP

8,2 mg de cloruro de sodio, USP

0,2 mg de polisorbato 80, NF

Ajustar el pH a 6,0 ∓ 0,5 usando ácido fosfórico, NF. Cantidad suficiente para 1 mL. Preferentemente almacenar a una temperatura entre 5 y 8EC.

Ejemplo 10

Formulación con 5,0 mg/mL de natalizumab

5,0 mg/mL de natalizumab

140 mM de NaCl

0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80

10 mM de fosfato de sodio

Ajustar el pH a 6,0 ∓ 0,5 usando ácido fosfórico. Opcionalmente almacenar a una temperatura entre alrededor de 5EC y alrededor de 8EC.

Ejemplo 11**Formulación con 10 mg/mL de natalizumab**

10,0 mg de natalizumab

1,4 mg de fosfato de sodio, USP

8,2 mg de cloruro de sodio, USP

0,2 mg de polisorbato 80, NF

Ajustar el pH a 6,0 $\pm$ 0,5 usando ácido fosfórico, NF. Cantidad suficiente para 1 mL. Preferentemente almacenar a una temperatura entre 5 y 8EC.

Ejemplo 12**Formulación con 10 mg/mL de natalizumab**

10,0 mg de natalizumab

1,4 mg de fosfato de sodio, USP

8,2 mg de cloruro de sodio, USP

0,1 mg de polisorbato 80, NF

Ajustar el pH a 6,0 $\pm$ 0,5 usando ácido fosfórico, NF. Cantidad suficiente para 1 mL. Preferentemente almacenar a una temperatura entre 5 y 8EC.

Ejemplo 13**Formulación con 20 mg/mL de natalizumab**

20,0 mg/mL de Natalizumab

140 mM de NaCl

0,02% (peso/volumen) de polisorbato 80

10 mM de fosfato de potasio

Ajustar el pH a 6,0 $\pm$ 0,5 usando ácido fosfórico y llevar el volumen a 125 mL. Opcionalmente almacenar la formulación a una temperatura entre alrededor de 5EC y alrededor de 8EC.

Ejemplo 15**Formulación de natalizumab liofilizado**

Otras formulaciones líquidas de anticuerpo a concentraciones elevadas, entre 20 y 200 mg/mL, pueden consistir en fosfato u otro tampón adecuado (tal como histidina, citrato, acetato o succinato) en concentraciones comprendidas entre 2 y 50 mM, para tamponar en el rango de pH comprendido entre 3,0 y 7,0. Más preferentemente, el pH es $6,0 \pm 0,5$. Se pueden añadir polioles (tales como sorbitol y manitol), disacáridos (tales como sacarosa o trehalosa) y aminoácidos (tales como glicina) en cantidades variables junto con cloruro de sodio para mantener la estabilidad y lograr una solución isotónica. El uso de tensoactivos, tales como pero no limitados a los polisorbatos, mejoran la estabilidad cuando se utilizan en el rango comprendido entre 0.001 y 2%. Para preparar una formulación líquida, se concentró natalizumab a 65 mg/mL en 10 mM de fosfato de sodio, 140 mM de cloruro de sodio, pH 6, con alrededor de 0,06% de polisorbato 80. La solución resultante era ligeramente opalescente pero sin particulados. La muestra contenía más de 99% de monómero sin agregados de elevado peso molecular ni especies de bajo peso molecular, según la cromatografía de exclusión por tamaño.

Se provee una formulación farmacéutica liofilizada estable. Debido a que el tampón fosfato sufre un cambio de pH durante el congelamiento, es necesario reemplazar el fosfato por un tampón diferente. Este tampón puede estar compuesto por histidina, citrato o succinato, con la capacidad de tamponar efectivamente en el rango de pH comprendido entre 3,0 y 7,0; más preferentemente en el rango de $6,0 \pm 0,5$.

Es necesario utilizar polioles (tales como el manitol) y azúcares (tales como la sacarosa) para proveer crio-protección y lio-protección. Estos polioles se pueden usar en forma individual o en combinación a fin de proveer estabilidad y permitir el ajuste de la tonicidad. Además, se pueden usar

aminoácidos (tal como la glicina) en niveles de entre 10 y 1000 mM para impedir la agregación.

Se pueden usar tensoactivos, tales como polisorbatos o poloxámeros, en niveles comprendidos entre 0,001% y 2,0% para proveer estabilidad antes de la liofilización y luego de la reconstitución, y para permitir tiempos de reconstitución más rápidos.

Luego de la etapa de purificación final, la proteína se puede formular usando ultrafiltración para la concentración y diafiltración para el intercambio en el tampón. La proteína también se puede formular usando cromatografía en columna para el intercambio en el tampón. También se puede utilizar alguna combinación de estas técnicas.

Además, la concentración de proteína final deseada se puede obtener llenando con concentraciones de proteína y excipiente menores que las deseadas y reconstituyendo a un volumen menor. Por ejemplo, se puede usar un volumen de llenado de 2,5 mL de una solución de 40 mg/mL, seguido de reconstitución con 1 mL para obtener una solución de 100 mg/mL.

Por ejemplo, se liofilizó natalizumab a una concentración de 20 mg/mL en una solución que contenía 5 mM de histidina, 20 mg/mL de sacarosa y 0,02% de polisorbato 80, pH 6. Se llenaron frascos de vidrio de borosilicato de 10 mL con cantidades de 5 mL por frasco, y los frascos se cubrieron con tapones de liofilización de goma de butilo gris. La liofilización se llevó a cabo usando un liofilizador modelo Virtis Gensis. El producto se congeló a una temperatura de almacenamiento de -60°C durante 10 horas y luego esta temperatura se elevó a -40°C. El secado primario se realizó a una temperatura de almacenamiento de -10°C y una presión de 100 mTorr durante 20 horas. El secado secundario se realizó a una temperatura de

9

almacenamiento de 25°C con una presión de 100 mTorr durante 10 horas.

Los tapones de los frascos se colocaron bajo condiciones de vacío.

A continuación los frascos se reconstituyeron usando 1 mL de WFI estéril para obtener una formulación que contenía 100 mg/mL de natalizumab. Las muestras se analizaron inmediatamente después de la liofilización y luego de dos semanas de almacenamiento en forma liofilizada a 40 grados. En ambos casos los tiempos de reconstitución fueron inmediatos. Las soluciones reconstituidas eran translúcidas e incoloras, libres de material particulado. Las muestras contenían más de 99% de monómeros según una cromatografía de exclusión por tamaño, sin agregados de elevado peso molecular ni especies de bajo peso molecular. Luego de dos semanas de almacenamiento a 40 grados, la muestra evidenció una potencia del 94% respecto de la referencia (especificación 80-125%).

Todas las patentes citadas y publicaciones mencionadas en esta solicitud se incorporan a la presente en su totalidad y a todos los efectos.

7

REIVINDICACIONES:

Reivindicamos:

1. Una formulación farmacéutica acuosa, estable que comprende una inmunoglobulina, un amortiguador de fosfato, un polisorbato, y cloruro de sodio.
2. La formulación de la reivindicación 1, en donde el polisorbato es polisorbato 80.
3. La formulación de la reivindicación 2, en donde el polisorbato 80 está presente en una cantidad de cerca de 0.001% a cerca de 2.0% (p/v).
4. La formulación de la reivindicación 3, en donde el polisorbato 80 está presente en la cantidad de cerca de 0.02% (p/v).

5. La formulación de la reivindicación 1, en donde la inmunoglobulina está presente en una cantidad de cerca de 0.1 mg/mL a cerca de 200 mg/mL.
6. La formulación de la reivindicación 5, en donde la inmunoglobulina está presente en una cantidad de cerca de 1.7 mg/mL.
7. La formulación de la reivindicación 5, en donde la inmunoglobulina está presente en una cantidad de cerca de 5 mg/mL.
8. La formulación de la reivindicación 5, en donde la inmunoglobulina está presente en una cantidad de cerca de 20 mg/mL.
9. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la formulación tiene un pH de cerca de 3.0 a cerca de 7.0.

4

10. La formulación de la reivindicación 9, en donde el pH es de cerca de 5.5 a cerca de 6.5.

11. La formulación de la reivindicación 10, en donde el pH es de cerca de 6.0 ± 0.5 .

12. La formulación de la reivindicación 1, en donde la formulación está en un volumen fijo y la inmonoglobulina está presente en la cantidad de cerca de 50 mg/mL.

13. La formulación de la reivindicación 12, en donde la inmunoglobulina se une a la integrina alfa-4.

14. La formulación de la reivindicación 13, en donde la inmunoglobulina es natalizumab.

15. La formulación de la reivindicación 1, en donde el amortiguador de fosfato es de pH 6.0 ± 0.5 , el polisorbato es polisorbato 80 y está presente en una cantidad de cerca de 0.02% (p/v), la inmunoglobulina

.

!

es natalizumab, y en donde la formulación es estable en una temperatura de cerca de 2°C a cerca de 8°C durante al menos 6 meses.

16. La formulación de la reivindicación 15, en donde el natalizumab está presente en una cantidad de cerca de 20 mg/mL a cerca de 150 mg/mL.

17. La formulación de la reivindicación 1, en donde la formulación es isotónica.

18. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 o 17, en donde la inmunoglobulina es anticuerpo monoclonal.

19. La formulación de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo monoclonal es natalizumab.

20. La formulación de la reivindicación 18-19, en donde el anticuerpo está presente en una cantidad de cerca de 0.1 mg/mL a cerca de 200 mg/mL.

21. La formulación de la reivindicación 19, en donde el anticuerpo está presente en una cantidad de cerca de 1 mg/mL a cerca de 150 mg/mL.
22. La formulación de la reivindicación 21, en donde el anticuerpo está presente en una cantidad de cerca de 1.7 mg/mL o cerca de 50 mg/mL.
23. La formulación de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo está presente en la cantidad de cerca de 15 mg/mL a cerca de 50 mg/mL.
24. La formulación de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo está presente en la cantidad de cerca de 20 mg/mL.
25. La formulación de la reivindicación 1, en donde la formulación además comprende histidina.

26. La formulación de la reivindicación 25, en donde el polisorbato es polisorbato 80.

27. Un método para tratar un paciente con peso variable para una condición con una cantidad terapéutica de una inmunoglobulina que comprende administrar una formulación de la reivindicación 1 a dicho paciente en donde la condición es tratada mediante la administración de la formulación.

28. El método de la reivindicación 27, en donde la inmunoglobulina es natalizumab.

29. Una composición que comprende una fosfato de sodio, a polisorbato, una proteína y NaCl con un pH de 6.0 ± 0.5 , en donde la composición es estable cuando se almacena a cerca de 5 °C a cerca de 8°C por más de 6 meses.

30. La composición de la reivindicación 29, en donde el polisorbato es polisorbato 80 y está presente en una cantidad de cerca de 0.001% a cerca de 2.0% (p/v).

31. La composición de la reivindicación 29, en donde la proteína es una inmunoglobulina que está presente en una cantidad de cerca de 0.01 mg/mL a cerca de 200 mg/mL.

32. La composición de la reivindicación 29, en donde el polisorbato es polisorbato 80 y está presente en la cantidad de cerca de 0.02% (p/v), el NaCl está presente en la cantidad de 150 mM, El amortiguador de fosfato está presente en la cantidad de 10 mM, y la inmunoglobulina es natalizumab y está presente en la cantidad de 1.7 mg/mL, 5 mg/mL, 20 mg/mL o 50 mg/mL.

33. Un método para preparar una formulación que contiene una proteína estable que comprende mezclar fosfato de sodio, cloruro de sodio, un polisorbato y una proteína y ajustar el pH de la mezcla con ácido fosfórico a cerca de $\text{pH } 6.0 \pm 0.5$.

34. El método para preparar una formulación que contiene proteína estable de la reivindicación 33, en donde el



fosfato de sodio está presente en una cantidad de cerca de 10 mM, el cloruro de sodio está presente en una cantidad de cerca de 150 mM, el polisorbato es polisorbato 80 y está presente en una cantidad de cerca de 0.02% (p/v) y la proteína es natalizumab.

35. El método para preparar una formulación que contiene proteína estable de la reivindicación 33, en donde el natalizumab está presente en una cantidad de cerca de 20 mg/mL a cerca de 200 mg/mL.

36. El método para preparar una formulación que contiene proteína estable de la reivindicación 35, en donde el natalizumab está presente en una cantidad de cerca de 150 mg/mL.

37. El método para preparar una formulación que contiene proteína estable de la reivindicación 33, en donde la proteína es liofilizada en la formulación de la reivindicación 1.

38. El método para preparar una formulación que contiene proteína estable de la reivindicación 37, en donde el polisorbato es polisorbato 80 y está presente en una cantidad de cerca de 0.02% (p/v) y la proteína es natalizumab.

39. El método para preparar una formulación que contiene proteína estable de la reivindicación 37, en donde la formulación además comprende histidina.

40. El método para preparar una formulación que contiene proteína estable de la reivindicación 33, en donde la proteína se liofiliza en una solución que comprende 5 mM de histidina, 20 mg/mL sucrosa y 0.02% de polisorbato 80 en un pH 6, y en donde la proteína es natalizumab en una concentración de 20 mg/mL.

41. Un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la formulación estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-29.

42. Un método para tratar un paciente con peso variable para una condición, que comprende administrar simultánea o secuencialmente al paciente una combinación terapéuticamente efectiva de una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24 y un compuesto o terapia efectiva contra la condición.

43. El uso de la formulación estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una condición en un paciente con una condición de peso variable en donde el medicamento es efectivo para tratar dicha condición.

44. El uso de la formulación estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24 para la preparación de un medicamento para tratar una condición en un paciente con una condición de peso variable, en donde el medicamento es una combinación de una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24 y un compuesto o terapia, y en donde dicho medicamento es efectivo para tratar la condición.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

**SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))**

(PCT Rule 47.1(c))

To:

REA, Teresa, Stanek
BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, LLP
PO BOX 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

16 June 2005 (16.06.2005)

Applicant's or agent's file reference

034008-054

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US2004/003873

International filing date (day/month/year)

09 February 2004 (09.02.2004)

Priority date (day/month/year)

10 February 2003 (10.02.2003)

Applicant

ELAN PHARMACEUTICALS, INC. et al

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does not apply, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.
2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
26 August 2004 (26.08.2004)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, NA, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BW, BZ, CA, CF, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SG, SK, SL, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For regular updates on the applicable time limits (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

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

Authorized officer

Ellen Moyse

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 89 75

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
TERESA STANEK REA
BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, LLP
PO BOX 1404
ALEXANDRIA, VA 22313-1404

19

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

11 MAY 2005

Applicant's or agent's file reference
034008-054

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US04/03873

International filing date
(day/month/year) 09 February 2004 (09.02.2004)

Applicant
ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 740 14 35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☒ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Yunsoo Kim

Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/220 (January 2004)

-- -- (See notes on accompanying sheet)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 034008-054	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US04/03873	International filing date (day/month/year) 09 February 2004 (09.02.2004)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 10 February 2003 (10.02.2003)
Applicant ELAN PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 9 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. ☐

With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐

Unity of invention is lacking (See Box No. III)

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐

none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/03873

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 39/00, 39/38, 39/395; C07K 1/00
US CL : 424/133.1, 184.1

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 424/133.1, 184.1

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EAST, DIALOG, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, CHEMAB

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	WO 97-04801(GENENTECH INC.) 13 February 1997 (13.02.97) see entire document	1-13, 15-18, 19-27, 29-33, 35-39, 41-44
Y, P	US 2003/0152627A1 (BECKERT et al) 14 August 2003 (14.08.2003), see entire document	14, 19, 28, 34, 40 14, 19, 28, 34, 40

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

04 April 2005 (04.04.2005)

Date of mailing of the international search report

11 MAY 2005

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Yunsoo Kim

Telephone No. 571-272-1600

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
TERESA STANEK REA
BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, LLP
PO BOX 1404
ALEXANDRIA, VA 22313-1404

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) **11 MAY 2005**

Applicant's or agent's file reference

034008-054

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US04/03873

International filing date (day/month/year)

09 February 2004 (09.02.2004)

Priority date (day/month/year)

10 February 2003 (10.02.2003)

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

IPC(7): A61K 39/00, 39/38, 39/395; C07K 1/00 and US Cl.: 424/133.1, 184.1

Applicant

ELAN PHARMACEUTICALS, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/ US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Yunsoo Kim

Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (January 2004)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US04/03873

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

☐ a sequence listing

☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐ in written format

☐ in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐ contained in international application as filed.

☐ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US04/03873

Box No. II Priority

1. ☐ The following document has not yet been furnished:

☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rules 43bis.1 and 66.7(a)).

☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rules 43bis.1 and 66.7(b)).

Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

2. ☒ This opinion has been established as if no priority has been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

The priority claim has been found invalid because the filing date of the priority application is outside the time period provided in PCT Rule 4.10.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US04/03873

3
94

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims 14, 19, 28, 30 and 34	YES
	Claims 1-13, 15-27, 29-33, 35-38 and 41-44	NO
Inventive step (IS)	Claims NONE	YES
	Claims 1-44	NO
Industrial applicability (IA)	Claims 1-44	YES
	Claims NONE	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-44 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus meet industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

Claims 1-13, 15-18, 19-27, 29-33, 35-39 and 41-44 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by WO 97/04801.

'801 publication teaches an antibody (i.e. integrin alpha subunit, p. 7 lines 10-16) formulation can be prepared in phosphate buffer at pH 6-9, 0.2M NaCl (p. 26, lines 17-21), 0.001-0.5% polysorbate 80 (p. 15, lines 24-26), in presence of sucrose and histidine (p. 9, lines 9-14), concentration of antibody between 5-50mg/ml (p. 3, lines 19-28) and 50-400mg/ml (p. 17, lines 1-5).

'801 publication also teaches the antibody is monoclonal (p. 10-12), humanized (p. 8, lines 4-20), stable at 2-8°C for 6 months (p. 8, lines 24-25), article of manufacture (p. 18, lines 14-30), isotonic (p. 9, lines 6-8, claim 8) and method of preparing the composition (claims 9-13).

Claims 14, 19, 29, 34 and 40 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over the prior art as applied in the immediately preceding paragraph and further in view of US2003/015627.

'627 publication teaches natalizumab ([0086]) in antibody formulation.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

To:

REA, Teresa, Stanek
BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, LLP
PO BOX 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

(PCT Rule 47.1(c))

Date of mailing (day/month/year)

10 September 2004 (10.09.2004)

Applicant's or agent's file reference

034008-054

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US2004/003873

International filing date (day/month/year)

09 February 2004 (09.02.2004)

Priority date (day/month/year)

10 February 2003 (10.02.2003)

Applicant

ELAN PHARMACEUTICALS, INC. et al

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does apply, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).
2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
26 August 2004 (26.08.2004)

CH

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

FI, LU, SE, TZ, UG, ZM

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 20 MONTHS from the priority date.

In practice, time limits other than the 20-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For regular updates on the applicable time limits (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

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

Authorized officer

Ellen Moyse

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 89 75

PATENT COOPERATION TREATY

28

96

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

REA, Teresa, Stanek
BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, LLP
PO BOX 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 18 June 2004 (18.06.2004)	
Applicant's or agent's file reference 034008-054	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2004/003873	International filing date (day/month/year) 09 February 2004 (09.02.2004)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 10 February 2003 (10.02.2003)
Applicant ELAN PHARMACEUTICALS, INC. et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
10 Febr 2003 (10.02.2003)	60/445,818	US	22 April 2004 (22.04.2004)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.89.75	Authorized officer Aurora CENDANA (Fax : 338 89 75) Telephone No. (41-22) 338 8906
--	--

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.150)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	034008-054
I	Title of invention	IMMUNOGLOBULIN FORMULATION AND METHOD OF PREPARATION THEREOF
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name:	ELAN PHARMACEUTICALS, INC.
II-5	Address:	800 Gateway Boulevard South San Francisco, California 94080 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	650.877.7665
II-9	Facsimile No.	650.877.8370
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	BURKE, David, J.
III-1-5	Address:	5957 Chaboly Terrace Oakland, California 94618 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

II-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	BUCKLEY, Shaun, E.
III-2-5	Address:	427 Stockton St. #809 San Francisco, California 94108 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is:	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	LEHRMAN, Sherwood, Russ
III-3-5	Address:	1731 Penny Way Los Altos, California 94024 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
III-4	Applicant and/or inventor	
III-4-1	This person is:	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	O'CONNOR, Barbara, Horsey
III-4-5	Address:	150 Dale Avenue San Carlos, California 94070 United States of America
III-4-6	State of nationality	US
III-4-7	State of residence	US
III-5	Applicant and/or inventor	
III-5-1	This person is:	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	CALLOWAY, James
III-5-5	Address:	4893 Drakewood Terrace San Diego, California 92130 United States of America
III-5-6	State of nationality	US
III-5-7	State of residence	US

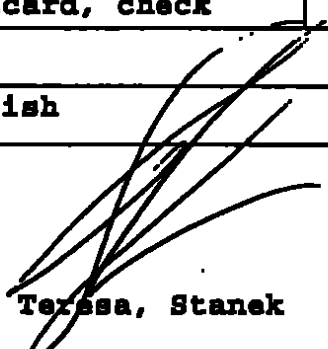
PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	REA, Teresa, Stanek
IV-1-2	Address:	BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, LLP PO BOX 1404 Alexandria, Virginia 22313-1404 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	(703) 836-6620
IV-1-4	Facsimile No.	(703) 836-2021
IV-1-8	Agent's registration No.	30,427
IV-2	Additional agent(s)	additional agent(s) with same address as first named agent
IV-2-1	Name(s)	MEYER, Mercedes, K. (44,939); YELLIN, Deborah, H. (45,904)
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	10 February 2003 (10.02.2003)
VI-1-2	Number	60/445,818
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1
VII-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	-
IX-2	Description	26	-
IX-3	Claims	5	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	0	-
IX-7	TOTAL	37	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-18	other:	transmittal letter, postcard, check	
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name:		
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

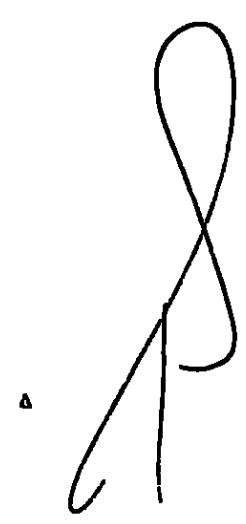
11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DE:
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION ^{PCT} MODELO DE UTILIDAD	()	()
Indicacion de que se solicita la concesion de una patente	()	(x)
Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	(x)
- Descripcion de la invencion	()	(x)
Dibujos de ser estos pertinentes.	()	(x)
Comprobante de Pago de las tasas establecidas		
COMPLETA (x) INCOMPLETA ()		
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representacion grafica o fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicacion de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
- Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
Representación grafica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		

Firma Responsable

Fecha



103

p-663

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D'ALEMAN DILIA MARIA

REFERENCIA	Radicación No.	5 91313
	Solicitud internacional	PCT/US2004/003873
	Fecha inicio fase nacional	10/09/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	11082

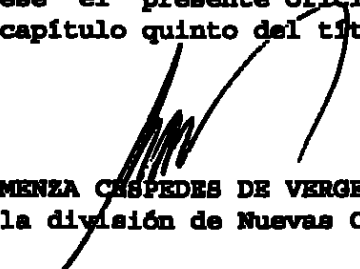
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 23 JUN. 2005
adpai