

BT

Organización CSA Ltda



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT

Delegatura de Propiedad Industrial  
División de Nuevas Creaciones

DVN  
NOV



SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-87987

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: "FORMULACIONES DE POLIPÉPTIDO LÍQUIDAS ESTABILIZADAS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL: A61K 39/395, C07K 16/18

71. SOLICITANTE: WYETH

DOMICILIO: NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. APODERADO: ALVARO CORREA ORDOÑEZ  
T.P.No.20.281

22. BOGOTA, D.C., 28 de Agosto de 2007

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



Id. 07-087987- -00000-0000

Fecha: 2007-08-28 16:30:06 Dep. 2020 NUECREACION  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 233

ción

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT  
ENTRADA EN FASE NACIONAL

28/08/2007

|                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                            |                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div>1</div> <div>SOLICITUD DE :</div> <div><div><div>X</div>Patente de Invención</div><div><div>X</div>Capítulo I.</div><div><div></div>Patente de Modelo de Utilidad</div><div><div></div>Capítulo II.</div></div> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                            |                                                                                                                                                                                       |
| <div>2</div> <div>SOLICITANTE</div> <div>(71)</div>                                                                                                                                                                  | <div>Nombre: WYETH</div> <div>Dirección: Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940, Estados Unidos de América</div> <div>Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América</div> <div>Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América</div> <div>Teléfono: Fax:</div> <div>E-Mail:</div>                                                                                  |                                            | <div>IDENTIFICACION</div> <div>C.C. <div></div> NIT <div></div></div> <div>C.E. <div></div> Otro <div></div></div> <div>Cual</div> <div>Número</div>                                  |
| <div>3</div> <div>REPRESENTANTE</div> <div>O APODERADO</div>                                                                                                                                                         | <div>Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ</div> <div>Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6</div> <div>Teléfono: 634 1500 Fax: 376 2211</div> <div>E-Mail: office.bogota@bakernet.com</div>                                                                                                                                                                                                                      |                                            | <div>IDENTIFICACION</div> <div>C.C. <div>X</div> NIT <div></div></div> <div>C.E. <div></div> Otro <div></div></div> <div>Cual</div> <div>Número 79.143.366 de Usaquén TP 20.281</div> |
| <div>4</div> <div>INVENTOR (ES)</div> <div>(72)</div>                                                                                                                                                                | <div>Nombre: LUISI, Donna, WARNE, Nicholas W. y KANTOR, Angela</div> <div>Dirección: 75 Boston Street, North Andover, Massachusetts 01845, Estados Unidos de América; 27 Farwood Drive, Andover, Massachusetts 01810, Estados Unidos de América y 118 South Road, Pepperell, Massachusetts 01463, Estados Unidos de América, respectivamente.</div> <div>Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses</div> |                                            |                                                                                                                                                                                       |
| <div>5</div> <div>PCT (85)</div> <div>Solicitud Internacional No. PCT/US2006/004741</div> <div>Publicación Internacional No. WO/2006/081587</div> <div>Fecha 27-ENE-06</div> <div>Fecha 03-AGO-06</div>              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                            |                                                                                                                                                                                       |
| <div>6</div> <div>Título (54)</div> <div>FORMULACIONES DE POLIPÉPTIDO LÍQUIDAS ESTABILIZADAS</div>                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                            |                                                                                                                                                                                       |
| <div>7</div> <div>Clasificación Internacional (51)</div> <div>A61K 39/395, C07K 16/18</div>                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                            |                                                                                                                                                                                       |
| <div>8</div> <div>Prioridad</div> <div>SI <div>X</div> NO <div></div></div>                                                                                                                                          | <div>(33) Pais de Origen</div> <div>US</div>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <div>(32) Fecha</div> <div>28-ENE-05</div> | <div>(31) Número de Solicitud</div> <div>60/648,639</div>                                                                                                                             |
| <div>9</div> <div>Comprobante de pago No. 07-31030</div> <div>Fecha 17-ABR-07</div>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                            |                                                                                                                                                                                       |

10

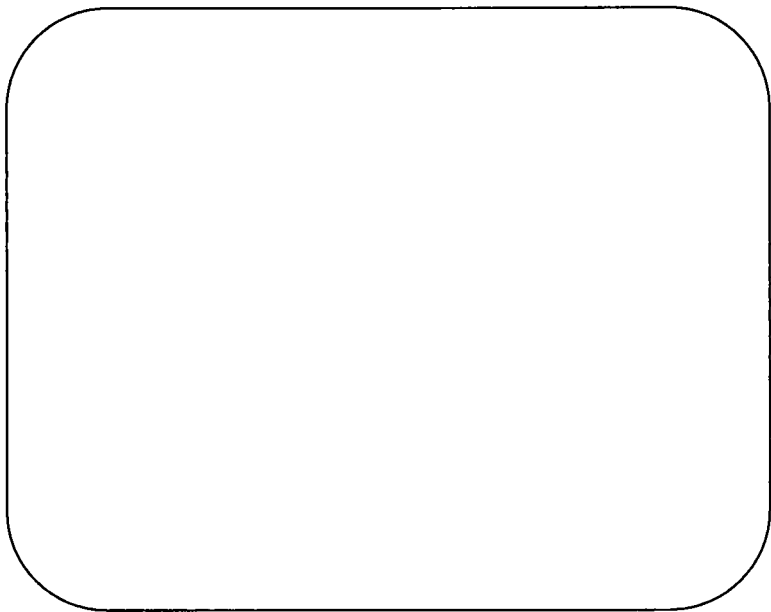
ANEXOS

00002

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extracto, Búsqueda Internacional y Opinión Escrita y notificación de presentación de documento de prioridad.

11

FIGURA CARATERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

009

00003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-087987- -00000-0000

Fecha: 2007-08-28 16:30:06 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 233

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 31,030  
FECHA : ABRIL 17 DE 2007

## \*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE             | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | No. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|-------------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|---------------|
| RAISBECK LARA RODRIGUEZ | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00110-6 | 54690755 | 17/04/2007 | 64,180,000.00 |

## \*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------------------|-------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 482,000.00     |
|       |                         | TOTAL :                             | \$ 482,000.00  |

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_



TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1207073 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

00000

## PODER OTORGADO POR WYETH

### APOSTILLA

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR:  
MICHELLE L MC GOWAN
3. QUIEN ACTÚA EN CALIDAD DE NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
4. LLEVA EL SELLO DE MICHELLE L MC GOWAN, NOTARIO

### CERTIFICADO

5. EN TRENTON, NUEVA JERSEY
6. EL 3 DE ABRIL DE 2007
7. POR BRADLEY ABELOW, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. N° A287736
9. SELLO (APARECE ADHERIDO SELLO DORADO)
10. FIRMA (FIRMADO) BRADLEY ABELOW

  
JAIME A. GARAVITO B  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
Res 034 de Enero 11 de 1983  
MINISTERIO DE JUSTICIA

[No se traduce el texto del poder por estar en inglés y en español]

[No se traduce la Certificación Notarial por estar en inglés y en español]

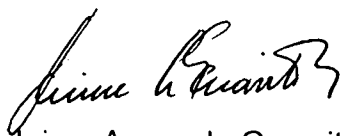
(Firmado) Michelle L. McGowan, Notario Público

(Sello en tinta que dice: "Michelle L. McGowan, Notario Público, Estado de Nueva Jersey. No. 2108903. Calificado en el Condado de Morris. Comisión vence el 09 de febrero de 2011")

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 1207073 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

[Sello notarial realizado que dice: "Michelle L. McGowan, Notario Público, Nueva Jersey"]

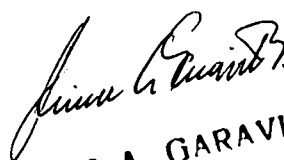
-----  
La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.



Jaime Armando Garavito Burgos  
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá

Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 82805



JAIME A. GARAVITO B  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
Res 034 de Enero 11 de 1983  
MINISTERIO DE JUSTICIA

APOSTILLE

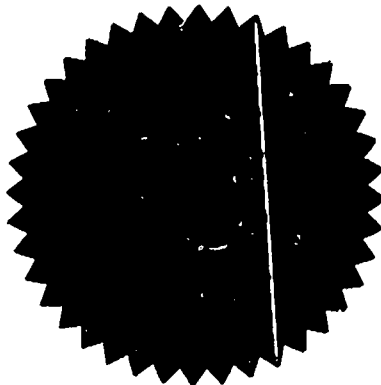
00000

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:  
MICHELLE L MC GOWAN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:  
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:  
MICHELLE L MC GOWAN, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 3RD DAY OF APRIL 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A287736
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



*Bradley Abelow*

Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda  
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor  
Bogotá, Colombia

NIT: 860.068.840-3  
Tel: +57 1 634 1500  
Fax: +57 1 376 2211  
www.bakernet.com

00007

**POWER OF ATTORNEY**

The undersigned.

**WYETH**

with offices at

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,  
United States of America

declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or  
OLGA GEORGETTE OTERO and/or  
RICARDO METKE and/or  
JUAN PABLO CONCHA**

All members of the law firm Raisbeck, Lara, Rodriguez & Rueda, with domicile at Av. 82 No. 10 – 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient power of attorney with respect to Colombian patent application(s) based on PCT/US2006/004741 and entitled “STABILIZED LIQUID POLYPEPTIDE FORMULATIONS” and to obtain patent protection thereof, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of a patent(s) based upon said patent application(s), including filing of assignments, change of name or address, voluntary cancellation; and defending oppositions, cancellations, nullity, writ mandamus, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights.

I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 29<sup>a</sup> day of March 2007

**Signature of the person issuing the Power**

**WYETH**

  
William H. Calnan  
Assistant Secretary

**PODER DE ABOGADO**

La abajo firmada,

**WYETH**

con oficinas en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,  
Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o  
OLGA GEORGETTE OTERO y/o  
RICARDO METKE y/o  
JUAN PABLO CONCHA**

Todos miembros de la firma de abogados Raisbeck, Lara, Rodríguez & Rueda, con domicilio en la Av. 82 No. 10 – 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, y hasta tanto ellos continúen siendo miembros de la firma, poder especial amplio y suficiente con respecto a la solicitud(es) de patente en Colombia basada(s) en PCT/US2006/004741 y titulada FORMULACIONES DE POLIPEPTIDOS LIQUIDOS ESTABILIZADOS

y para obtener la protección de patente de la misma, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de la(s) patente(s) de invención basada(s) en la mencionada solicitud de patente, incluyendo presentación de traspasos, cambio de nombre o dirección, cancelación voluntaria; y defensa en oposiciones, cancelaciones, nulidades, la tutela, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 29 días del mes de marzo de 2007

**Firma de la persona que firma el Poder**

NOTARIAL CERTIFICATIONCERTIFICACION NOTARIAL

On this 29<sup>th</sup> day of March  
2007, the undersigned Notary

A los 29 días del mes de marzo  
de 2007, el suscrito Notario

**CERTIFIES**

1. That **William H. Calnan**

**DA FE**

1 Que **William H. Calnan**

set his hand on the foregoing document.

suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3. That the grantor has executed the foregoing document as

3 Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

*Assistant Secretary*

*Subsecretario*

of the judicial person **WYETH**

de la persona jurídica **WYETH**

4. That the judicial person **WYETH**  
having its home office in

4 Que la persona jurídica **WYETH**  
con sede en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,  
United States of America

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,  
Estados Unidos de América

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

5 Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Minutes of the Borrard of Directors Meeting held on April 26, 2006.

Actas de la reunión de la Junta Directiva celebrada el 26 de abril de 2006

*Michelle L. McGowan*  
Notary Public

El Notario Público

**MICHELLE L. MCGOWAN**  
Notary Public, State of New Jersey  
No. 2108903  
Qualified in Morris County  
Commission Expires Feb. 9, 2011

000003  
TRADUCCIÓN OFICIAL N° 130707 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

### APOSTILLA

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR:  
MICHELLE L MC GOWAN
3. QUIEN ACTÚA EN CALIDAD DE NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
4. LLEVA EL SELLO DE MICHELLE L MC GOWAN, NOTARIO

### CERTIFICADO

5. EN TRENTON, NUEVA JERSEY
6. EL 3 DE ABRIL DE 2007
7. POR BRADLEY ABELOW, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. N° A287703
9. SELLO (APARECE ADHERIDO SELLO DORADO)
10. FIRMA (FIRMADO) BRADLEY ABELOW

-----  
AM101965

### DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, Michelle L. McGowan, Asociado de Legalizaciones de Wyeth, por medio del presente certifico que la copia anexa ha sido comparada con la Cesión original (para USSN 60/648.639 y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero, para la invención titulada: "FORMULACIONES DE POLIPÉPTIDO")

  
JAIME A. GARAVITO B  
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL  
Res 034 de Enero 11 de 1983  
MINISTERIO DE JUSTICIA

00010

Fechado julio 27 de 2006 en Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

PARA SER USADO EN COLOMBIA

Estado de Nueva Jersey )  
 )  
 Condado de Morris )

(Firmado) Barbara A. Kiely, Notario Público

(Sello notarial realzado)

(Aparece en el encabezamiento de las páginas referentes a las cesiones:

2

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 130707 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

"Archivo No. AHN-072-1  
Patente")

(Aparece en el pie de página de las páginas referentes a las cesiones:  
"Cesión de Invención  
Solicitud Provisional")

### Cesión de Invención

En consideración del pago por la CESIONARIA a la CEDENTE de una contraprestación válida y suficiente cuyo recibo se acusa por medio del presente, los CEDENTES:

- (1) Nombre Completo del Inventor: Donna Luisi  
Residencia: 75 Boston Street, North Andover, MA 01845  
Ciudadanía: Estados Unidos de América
- (2) Nombre Completo del Inventor: Nicholas W. Warne  
Residencia: 27 Farrwood Drive, Andover, MA 01810  
Ciudadanía: Estados Unidos de América
- (3) Nombre Completo del Inventor: Angela Kantor  
Residencia: 118 South Road, Pepperell, MA 01463  
Ciudadanía: Estados Unidos de América

por medio del presente vende, cede y transfiere a la CESIONARIA:

Wyeth  
Five Giralda Farms  
Madison, New Jersey 07940

y los sucesores, CESIONARIOS y representantes legales de la CESIONARIA, la totalidad del derecho, título e intereses para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluyendo todos los derechos a reivindicar prioridad con respecto a la invención titulada:

  
JAIME A. GARAVITO B  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
Res 034 de Enero 11 de 1983  
MINISTERIO DE JUSTICIA

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 130707 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

## FORMULACIONES DE POLIPÉPTIDO LÍQUIDO ESTABILIZADO

e inventada por los CEDENTES y los siguientes inventores adicionales, si los hubiere:

y que se encuentra en la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 60/648.639 presentada el 28 de enero de 2005.

☐ Yo/nosotros los CEDENTES abajo firmantes, por medio del presente autorizamos y solicitamos insertar arriba el número de solicitud y la fecha de presentación cuando se conozcan,

[También verificar si se están cediendo solicitud(es) adicional(es)]

☒ y cualquier equivalente legal de la(s) misma(s) en un país extranjero

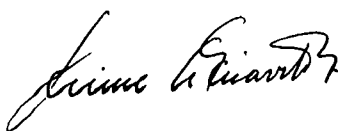
incluyendo el derecho a invocar prioridad, incluyendo todas y cada una de las mejoras divulgadas en la misma y en todas las patentes obtenidas para dicha invención a través de la anterior solicitud y cualquier solicitud provisional, no provisional, continuación, divisional, renovación o sustitución de la misma presentada posteriormente y en cuanto a la patente, cualquier re-expedición o nuevo examen de la misma.

Los CEDENTES por medio del presente acuerdan que no se ha hecho ni se hará o suscribirá ninguna cesión, venta, acuerdo o gravamen que pueda estar en conflicto con esta cesión.

  
JAIME A. GARAVITO B  
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL  
INGLÉS-ESPAÑOL-INGLÉS  
RESOLUCIÓN N° 034 DE ENERO 11 DE 1983  
MINISTERIO DE JUSTICIA

Los CEDENTES autorizan a la CESIONARIA para que haga solicitudes y para que reciban patentes para dicha invención en cualquiera de los mencionados países en su propio nombre, o en el nombre de la CEDENTE o a su elección.

Los CEDENTES acuerdan suscribir u obtener cualquier seguridad adicional necesaria del título a dicha invención y cualquier patente que pueda ser expedida para la misma y a entregar en cualquier momento y a solicitud y expensas de la CESIONARIA cualquier testimonio en cualquier derecho preexistente que impida el patentamiento de la invención, litigio o procedimiento relacionado y a suscribir todos los documentos que puedan ser necesarios o convenientes para perfeccionar el título a dicho invento o cualquier patente que pueda ser otorgada para el mismo a la CESIONARIA, sus sucesores, CESIONARIOS u otros representantes legales y a suscribir, en cualquier momento, a solicitud y expensas de la CESIONARIA, cualquier continuación, continuación parcial, divisional, renovación o sustitución de la misma y en cuanto a patentes a re-expedir o re-examinar las mismas, o cualesquier otras solicitudes adicionales de patentes para dicho invento o cualquier parte del mismo, todas las cuales y cualquier patente que se expida se ceden por medio del presente a la CESIONARIA y prestará todos los juramentos legales o declaraciones y hará todos los actos legales requeridos para adquirirlos, sin compensación adicional, pero a expensas de la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.



JAIME A. GARAVITO B  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
Res 034 de Enero 11 de 1983  
MINISTERIO DE JUSTICIA

1100014

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 130707 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

Los CEDENTES autorizan y solicitan al Comisionado de Patentes expedir todas y cada una de las patentes de los Estados Unidos para dicho invento, que resulte de cualquiera de las solicitudes a su CESIONARIA.

Es la intención de los CEDENTES que esta cesión tenga vigencia retroactiva a enero 28, 2005.

|             |                |
|-------------|----------------|
| (Firmado)   | Marzo 10, 2006 |
| Donna Luisi | Fecha          |

RECONOCIMIENTO

|                         |   |                          |
|-------------------------|---|--------------------------|
| Estado de Massachusetts | ) | Declaración juramentada: |
| Condado de Essex        | ) |                          |

El 10 de marzo de 2006, Donna Luisi, compareció personalmente ante mí, a quien conozco como la persona describa en el anterior instrumento y quien suscribió el mismo y reconoció haberlo suscrito en forma libre y espontánea para los fines consignados en él.

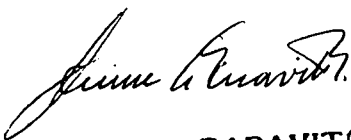
(Firma ilegible), Notario Público

---

|                             |                |
|-----------------------------|----------------|
| (Firmado) Nicholas W. Warne | Marzo 10, 2006 |
|                             | Fecha          |

RECONOCIMIENTO

|                         |   |                          |
|-------------------------|---|--------------------------|
| Estado de Massachusetts | ) | Declaración juramentada: |
| Condado de Essex        | ) |                          |

  
**JAIME A. GARAVITO B**  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
Dec 034 de Enero 11 de 1983  
MINISTERIO DE JUSTICIA

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 130707 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

El 10 de marzo de 2006, Nicholas W. Warne, compareció personalmente ante mí, a quien conozco como la persona describa en el anterior instrumento y quien suscribió el mismo y reconoció haberlo suscrito en forma libre y espontánea para los fines consignados en él.

(Firma ilegible), Notario Público

(Firmado)  
Angela Kantor

Marzo 10, 2006  
Fecha

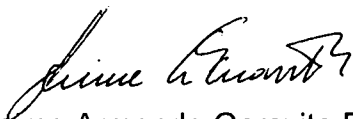
### RECONOCIMIENTO

Estado de Massachusetts )  
Condado de Essex ) Declaración juramentada:

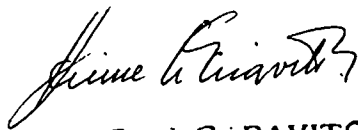
El 10 de marzo de 2006, Nicholas W. Warne, compareció personalmente ante mí, a quien conozco como la persona describa en el anterior instrumento y quien suscribió el mismo y reconoció haberlo suscrito en forma libre y espontánea para los fines consignados en él.

(Firma ilegible), Notario Público

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

  
Jaime Armando Garavito Burgos  
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá  
Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 82928

  
JAIME A. GARAVITO B  
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL  
C.C. N° 19.130.702 DE BOGOTÁ  
RESOLUCIÓN N° 034 DE ENERO 11 DE 1983  
MINISTERIO DE JUSTICIA

82013

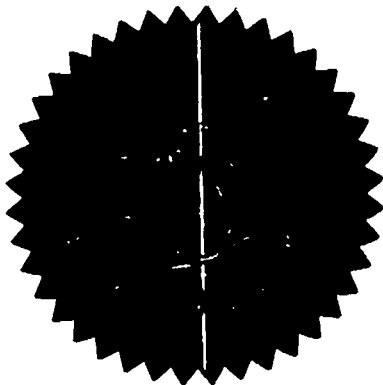
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:  
BARBARA A KIELY
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:  
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:  
BARBARA A KIELY, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 3RD DAY OF APRIL 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A287703
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



*Bradley Abelow*

AM101965

**AFFIDAVIT**

I, Michelle L. McGowan, Legalization Associate, Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 60/648,639, and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "POLYPEPTIDE FORMULATIONS") dated March 10, 2006 from Donna Luisi, Nicholas W. Warne and Angela Kantor to Wyeth and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 28<sup>th</sup> day of March, 2007, at Madison, New Jersey, United States of America.

Wyeth

Michelle L. McGowan  
Michelle L. McGowan  
Legalization Associate

TO BE USED IN COLOMBIA

**ACKNOWLEDGMENT**

State of New Jersey   )  
                                  )  
County of Morris       )

On this 28<sup>th</sup> day of March, 2007, before me personally appeared Michelle L. McGowan, Legalization Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and she acknowledged to me that she executed the same.

Barbara A. Kiely  
Notary Public

**Barbara A. Kiely ID. 33893**  
**Notary Public of New Jersey**  
**My Commission Expires June 20, 2009**

00010

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNORS of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, ASSIGNORS:

- (1) Full Name of Inventor: Donna Luisi  
Residence: 75 Boston Street, North Andover, MA 01845  
Citizenship: United States of America
- (2) Full Name of Inventor: Nicholas W. Warne  
Residence: 27 Farrwood Drive, Andover, MA 01810  
Citizenship: United States of America
- (3) Full Name of Inventor: Angela Kantor  
Residence: 118 South Road, Pepperell, MA 01463  
Citizenship: United States of America

---

hereby sell, assign and transfer to ASSIGNEE:

Wyeth  
Five Giralda Farms  
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled: **STABILIZED LIQUID POLYPEPTIDE FORMULATIONS**

and invented by ASSIGNORS and the following additional inventors, if any:

and which is found in U.S. Provisional Application No. 60/648,639 filed on: January 28, 2005

☐ I/we the ASSIGNORS signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

ASSIGNORS hereby covenant that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNORS authorize ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNORS' names, at its election.

ASSIGNORS covenant and agree to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNORS authorize and request the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

ASSIGNORS intend this assignment to be effective retroactive to January 28, 2005.

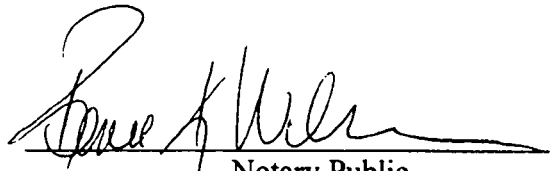
  
\_\_\_\_\_  
Donna Luisi

Date 10 March 2006

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts }  
County of Suffolk } ss: Essex

On the 10<sup>th</sup> day of March 2006, Donna Luisi personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

  
\_\_\_\_\_  
Notary Public

00000

Nicholas W. Warne  
Nicholas W. Warne

10 March 2006  
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts }  
County of Essex }  
SS:

On the 10 day of March 2006, Nicholas W. Warne personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

[Signature]  
Notary Public

00021

Angela Kantor  
Angela Kantor

10 March 2006  
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Essex }  
County of Worcestershire } ss:

On the 10<sup>th</sup> day of March 2006, Angela Kantor personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

[Signature]  
Notary Public

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
3 August 2006 (03.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2006/081587 A3**

(51) International Patent Classification:  
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)

(21) International Application Number:  
PCT/US2006/004741

(22) International Filing Date: 27 January 2006 (27.01.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/648,639 28 January 2005 (28.01.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **WYETH**  
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940  
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **LUISI, Donna**  
[US/US]; 75 Boston Street, North Andover, Massachu-  
setts 01845 (US). **WARNE, Nicholas, W.** [US/US]; 27  
Fairwood Drive, Andover, Massachusetts 01810 (US).  
**KANTOR, Angela** [US/US]; 118 South Road, Pepperell,  
Massachusetts 01463 (US).

(74) Agents: **MILASINCIC, Debra, J.** et al.; **LAHIVE &**  
**COCKFIELD, LLP**, 28 State Street, Boston, Massachusetts  
02109 (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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the  
claims and to be republished in the event of receipt of  
amendments

(88) Date of publication of the international search report:  
12 October 2006

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

(54) Title: STABILIZED LIQUID POLYPEPTIDE FORMULATIONS

(57) Abstract: The present invention provides formulations for maintaining the stability of polypeptides, in particular, therapeutic antigen-binding polypeptides such as antibodies and the like, for example, anti-A $\beta$  antibodies. The formulations generally include an antioxidant in a sufficient amount as to inhibit by-product formation, for example, the formation of high molecular weight polypeptide aggregates, low molecular weight polypeptide degradation fragments, and mixtures thereof. The formulations of the invention optionally comprise a tonicity agent, such as mannitol, and a buffering agent or amino acid such as histidine, and thus, the formula-  
tions are suitable for several different routes of administration.

WO 2006/081587 A3

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
3 August 2006 (03.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2006/081587 A2**

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:  
PCT/US2006/004741

(22) International Filing Date: 27 January 2006 (27.01.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/648,639 28 January 2005 (28.01.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH  
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, New Jersey 07940  
(US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LUISI, Donna  
[US/US]; 75 Boston Street, North Andover, Massachu-  
setts 01845 (US). WARNE, Nicholas, W. [US/US]; 27  
Farrwood Drive, Andover, Massachusetts 01810 (US).  
KANTOR, Angela [US/US]; 118 South Road, Pepperell,  
Massachusetts 01463 (US).

(74) Agents: MILASINCIC, Debra, J. et al.; LAHIVE &  
COCKFIELD, LLP, 28 State Street, Boston, Massachusetts  
02109 (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, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,  
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every  
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, 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 "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: STABILIZED LIQUID POLYPEPTIDE FORMULATIONS

(57) Abstract: The present invention provides formulations for maintaining the stability of polypeptides, in particular, therapeutic antigen-binding polypeptides such as antibodies and the like, for example, anti-A $\beta$  antibodies. The formulations generally include an antioxidant in a sufficient amount as to inhibit by-product formation, for example, the formation of high molecular weight polypeptide aggregates, low molecular weight polypeptide degradation fragments, and mixtures thereof. The formulations of the invention optionally comprise a tonicity agent, such as mannitol, and a buffering agent or amino acid such as histidine, and thus, the formula-  
tions are suitable for several different routes of administration.



WO 2006/081587 A2

## **STABILIZED LIQUID POLYPEPTIDE FORMULATIONS**

### **RELATED INFORMATION**

This application claims the benefit of US provisional patent application bearing Serial No. 60/648,639 (filed January 28, 2005), entitled "Stabilized Liquid Polypeptide Formulations." The entire content of the above-referenced application is incorporated herein by reference.

The contents of all other patents, patent applications, and references cited throughout this specification are also hereby incorporated by reference in their entireties.

### **BACKGROUND OF THE INVENTION**

To maximize the pharmacological benefit of any polypeptide, it is essential to have finished dosage forms that are stable, easily and reproducibly manufactured, and designed for standard routes of administration. Specifically, it is desirable to have stable, concentrated forms of bulk protein, *e.g.*, therapeutic polypeptides which, in turn, are suitable for further manufacture into finished dosage forms of the polypeptide, which can then be administered *via* a desired administration route.

In both bulk polypeptide and finished dosage forms, polypeptide stability can be affected by such factors as ionic strength, pH, temperature, repeated cycles of freeze/thaw and shear forces. Active polypeptide may be lost as a result of physical instabilities, including denaturation and aggregation (both soluble and insoluble aggregate formation), as well as chemical instabilities, including, for example, hydrolysis, deamidation, and oxidation, to name just a few. For a general review of stability of protein pharmaceuticals, see, for example, Manning, *et al.*, *Pharmaceutical Research* 6:903-918 (1989). In addition, it is desirable to maintain stability when carrier polypeptides are not included in the formulation.

While it is widely appreciated that these possible polypeptide instabilities can occur, until a polypeptide has been studied it is impossible to predict the particular instability problems that a particular protein may have. Any of these instabilities can potentially result in the formation of a polypeptide by-product or derivative having lowered activity, increased toxicity, and/or increased immunogenicity. Indeed, polypeptide precipitation can lead to thrombosis, non-homogeneity of dosage form and

immune reactions. Thus, the safety and efficacy of any pharmaceutical formulation of a polypeptide is directly related to its stability.

Accordingly, there continues to exist a need in the art for methods for improving protein stability during the concentration process as well as providing stability in the absence of other carrier proteins in a concentration sufficiently high for various routes of administration.

### **SUMMARY OF THE INVENTION**

The present invention provides formulations designed to provide stability and to maintain the biological activity of an incorporated biologically active protein, in particular an antigen-binding polypeptide, for example, an antibody or fragment thereof. The invention further provides polypeptide formulations, *i.e.*, stabilized liquid polypeptide formulations that are resistant to the formation of undesired polypeptide by-products.

The integrity of antigen-binding polypeptides for therapeutic use is especially important because if the polypeptide forms by-products, for example, aggregates or degradation fragments during storage, bioactivity may be lost, thereby jeopardizing the therapeutic activity of the molecule per unit dose. In addition, there is an acute desire to stabilize therapeutic polypeptides intended for specialized functions, for delivery and use in certain biological indications, for example, treating neurodegenerative conditions, where a polypeptide must traverse the blood-brain-barrier (BBB) and bind a target antigen.

Exemplary antibodies that must be stabilized for such use include those antibodies suitable for binding disease targets, in particular, antigenic disease targets, for example, cancer antigens, autoimmune antigens, allergens, and pathogens.

Accordingly, the invention has several advantages which include, but are not limited to, the following:

- stabilized liquid polypeptide formulations which are stabilized against the formation of polypeptide by-products by the addition of an antioxidant;
- stabilized liquid polypeptide formulations suitable for use in a variety of administration routes;

- methods for preparing therapeutic polypeptides for pharmaceutical use as a stabilized liquid polypeptide formulations; and
- stabilized A $\beta$ -binding polypeptide formulations suitable for use in treating neurodegenerative disease.

Accordingly, in one aspect, the invention provides a stabilized liquid polypeptide formulation designed to provide stability and to maintain the biological activity of the incorporated polypeptide. In yet another aspect, the present invention provides a formulation containing a therapeutically active antigen-binding polypeptide, and an antioxidant, for example, methionine or an analog thereof, wherein the antioxidant is in an amount sufficient to reduce the by-product formation of the polypeptide during storage of the formulation.

In one embodiment, the therapeutically active antigen-binding polypeptide component of the formulation is an antibody (*e.g.*, IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>), (*e.g.*, a human IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> isotype antibody) an antibody Fv fragment, an antibody Fab fragment, an antibody Fab'(2) fragment, an antibody Fd fragment, a single-chain antibody (scFv), a single domain antibody fragment (Dab), a beta-pleated sheet polypeptide comprising at least one antibody complementarity determining region (CDR), or a non-globular polypeptide comprising at least one antibody complementarity determining region (CDR).

In a particular embodiment, the liquid polypeptide formulations are stabilized against the formation of undesired by-products such as high molecular weight polypeptide aggregates, low molecular weight polypeptide degradation products, or mixtures thereof.

In a related embodiment, wherein the therapeutic antigen-binding polypeptide is an antibody, typical high molecular weight aggregates are, for example, antibody:antibody complexes, antibody:antibody fragment complexes, antibody fragment:antibody fragment complexes, or mixtures thereof. In general, high molecular weight complexes or by-products have a molecular weight greater than a monomer of the antigen-binding polypeptide, for example, in the case of an IgG antibody, greater than about 150 kD.

In another related embodiment, when the therapeutic polypeptide is an antibody, typical low molecular weight polypeptide degradation products are, for example, complexes consisting of an antibody light chain, an antibody heavy chain, an antibody

light chain and heavy chain complex, or mixtures thereof. In general, low molecular weight complexes or by-products have a molecular weight less than that of a monomer of the antigen-binding polypeptide, for example, in the case of an IgG antibody, less than about 150 kD.

In one aspect, the invention provides a stabilized formulation of a therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, an antibody or antigen-binding fragment thereof), methionine, where the methionine is present as an antioxidant in an amount sufficient to inhibit the formation of undesired by-products, a tonicity agent (*e.g.*, mannitol), where the tonicity agent is present in an amount sufficient to render the formulation suitable for administration, for example, intravenous infusion, and an amino acid (*e.g.*, histidine) or derivative thereof, where the amino acid or derivative thereof is present in an amount sufficient to maintain a physiologically suitable pH.

In one aspect, the invention provides a stabilized formulation of a therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, an antibody or antigen-binding fragment thereof), methionine, where the methionine is present as an antioxidant in an amount sufficient to inhibit the formation of undesired by-products, a tonicity agent (*e.g.*, mannitol), where the tonicity agent is present in an amount sufficient to render the formulation suitable for intravenous infusion, and an amino acid (*e.g.*, histidine) or derivative thereof, where the amino acid or derivative thereof is present in an amount sufficient to maintain a physiologically suitable pH.

In another aspect, the present invention provides a formulation including a therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, an antibody or antigen-binding fragment thereof), mannitol and histidine. In another aspect, the invention provides a stabilized formulation including a therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, an antibody or antigen-binding fragment thereof), methionine, mannitol, and histidine.

In certain embodiments, the therapeutically active antigen-binding polypeptide is an antibody (or portion or fragment thereof) that binds to an antigen selected from the antigen class that includes, for example, cancer antigens, autoimmune antigens, allergens, and pathogens.

In certain embodiments, the therapeutically active antigen-binding polypeptide is an A $\beta$  binding polypeptide, for example, an anti A $\beta$  antibody (or portion or fragment thereof). In some formulations, at least one A $\beta$  binding polypeptide is an anti A $\beta$

antibody, for example, that specifically binds to epitope within residues 1-7, 1-5, 3-7, 3-6, 13-28, 15-24, 16-24, 16-21, 19-22, 33-40, 33-42 of A $\beta$ , or Fab, Fab'(2) or Fv fragment thereof. Exemplary anti A $\beta$  antibodies specifically bind to an epitope within residues 1-10 of A $\beta$ , such as, for example, within residues 1-7, 1-5, 3-7, or 3-6 of A $\beta$ . Other exemplary anti A $\beta$  antibodies specifically bind to an epitope within residues 13-28 of A $\beta$ , such as, for example, within residues 16-21 or 19-22 of A $\beta$ . Yet other exemplary anti A $\beta$  antibodies specifically bind to a C terminal epitope of A $\beta$  such as, for example, 33-40 or 33-42 of A $\beta$ . In one embodiment, the A $\beta$  antibody is a humanized antibody, for example, a humanized 3D6 antibody, a humanized 10D5 antibody, a humanized 12B4 antibody, a humanized 15C11 antibody, or a humanized 12A11 antibody.

The therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof) may be present from about 0.1 mg/ml to about 200 mg/ml (*e.g.*, at about 20 mg/ml or 30mg/ml). The isotype of the antibody can be IgM, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 or any other pharmaceutically acceptable isotype. In preferred formulations, the isotype is human IgG1 or human IgG4. In some liquid formulations, the concentration of the anti A $\beta$  antibody is about 0.1 mg/ml to about 60 mg/ml, about 40 mg/ml to about 60 mg/ml, about 50 mg/ml, about 30 mg/ml, about 17 mg/ml to about 23 mg/ml, about 20 mg/ml, about 17 mg/ml, about 10 mg/ml, about 5 mg/ml, about 2 mg/ml, or about 1 mg/ml, preferably about 17 mg/ml to about 23 mg/ml

In certain embodiments, the mannitol is present in amount sufficient to maintain isotonicity of the formulation. Mannitol can be present from about 2% w/v to about 6% w/v (*e.g.*, at about 4% w/v). In various embodiments of the preceding aspects, the histidine may be present in an amount sufficient to maintain a physiologically suitable pH. Histidine (*e.g.*, L-histidine) may be present from about 0.1 mM to about 25 mM (*e.g.*, at about 10 mM).

In other embodiments, the formulation may further include an anti-oxidant such as methionine. The methionine may be present at about 0.1 mM to about 25 mM (*e.g.*, at about 10 mM). In another embodiment, the formulation may include a stabilizer such as polysorbate 80. The polysorbate 80 may be present from about 0.001% w/v to about 0.01% w/v (*e.g.*, at about 0.005% w/v). In certain embodiments, the formulation has a pH of about 5 to about 7 (*e.g.*, about 6).

In certain embodiments, the formulation may be stable to freezing. Additionally, the formulation may be suitable for administering parenterally, intravenously, intramuscularly, subcutaneously, intracranially, or epidurally. In various embodiments, the formulation may be suitable for targeted delivery to the brain or the spinal fluid of a subject. In other embodiments, the formulation may be substantially free of preservatives. The formulation may be stable for at least about 12 months, at least about 18 months, at least about 24 months, or at least about 30 months. In various embodiments, the formulation is stable at about -80°C to about 40°C, at about 0°C to about 25°C, or at about 2°C to about 8°C. Some formulations are stable for at least about 12 months, at least about 18 months, at least about 24 months, or at least about 30 months. Some formulations are stable at about -80°C to about 40°C, at about 0°C to about 25°C, at about 0°C to about 10°C, preferably at about -80°C to about -50°C or at about 2°C to about 8°C. Some formulations are stable for at least about 12 months at a temperature of above freezing to about 10°C and has a pH of about 5.5 to about 6.5.

In a particular aspect, the present invention provides a formulation suitable for intravenous administration including about 20 mg/mL of therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 4% mannitol and having a pH of about 6. In another aspect, the present invention provides a formulation suitable for intravenous administration including about 20 mg/mL therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof, about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 4% mannitol, about 0.01% polysorbate 80, and having a pH of about 6. In another aspect, the present invention provides a formulation suitable for intravenous administration including about 20 mg/mL therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 4% mannitol, about 0.005% polysorbate 80, and having a pH of about 6.

Some formulations are stable for at least about 12 months at a temperature of above freezing to about 10°C and has a pH of about 5.5 to about 6.5. Such formulation includes at least one therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof) at a concentration of about 1 mg/ml to about 30 mg/ml, mannitol at a concentration of about 4% w/v or NaCl at a concentration of about

150 mM, histidine or succinate at a concentration of about 5 mM to about 10 mM, and 10 mM methionine. One such formulation has a pH of about 6.0, about 1 mg/ml therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof) about 10 mM histidine and about 4% w/v mannitol. Other formulations are stable for at least about 24 months at a temperature of about 2°C to 8°C, and include polysorbate 80 at a concentration of about 0.001% w/v to about 0.01% w/v. Some of such formulations have a pH of about 6.0 to about 6.5 and include about 10 mM histidine, about 4% w/v mannitol and about 1 mg/ml, about 2 mg/ml or about 5 mg/ml therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof). Other such formulations include about 10 mM histidine, about 4% w/v mannitol, about 0.005% w/v polysorbate 80 and about 10 mg/ml, about 20 mg/ml or 30 mg/ml therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), preferably at a pH of about 6.0 to about 6.2.

A preferred formulation is stable for at least about 24 months at a temperature of about 2°C to about 8°C, has a pH of about 5.5 to about 6.5, and includes about 2 mg/ml to about 23 mg/ml, preferably about 17 mg/ml to about 23 mg/ml, of a humanized 3D6 antibody, about 10 mM histidine and about 10 mM methionine. Preferably, the formulation further includes about 4% w/v mannitol. The formulation preferably includes polysorbate 80 at a concentration of about 0.001% w/v to about 0.01% w/v, more preferably about 0.005% w/v polysorbate 80. In such formulations, the humanized 3D6 antibody can be present at a concentration of about 20 mg/ml to about 23 mg/ml.

Another formulation is stable for at least about 24 months at a temperature of about 2°C to about 8°C, has a pH of about 5.5 to about 6.5, and includes about 2 mg/ml to about 23 mg/ml of therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 10 mM succinate, about 10 mM methionine, about 4% w/v mannitol and about 0.005% w/v polysorbate 80. In some of such formulations, the therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof) concentration is present at a concentration of about 17 mg/ml to about 23 mg/ml.

The invention also provides a formulation that is stable when thawed from about -50°C to about -80°C, has a pH of about 6.0 and includes about 40 to about 60 mg/ml of therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding

fragment thereof), about 1.0 mg/ml to about 2.0 mg/ml histidine, about 1.0 mg/ml to 2.0 mg/ml methionine and about 0.05 mg/ml polysorbate 80. Preferably, mannitol is excluded.

The present invention also provides a liquid formulation including therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), mannitol and histidine. In some of such formulations, the therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof) is present from about 1 mg/ml to about 30 mg/ml. Preferably, the mannitol is present in an amount sufficient to maintain isotonicity of the formulation. Preferably, the histidine is present in an amount sufficient to maintain a physiologically suitable pH. One such formulation includes about 20 mg/mL therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 4% mannitol and has a pH of about 6. Another such formulation includes about 30 mg/mL therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 10 mM succinate, about 10 mM methionine, about 6% mannitol and has a pH of about 6.2. Yet another such formulation includes about 20 mg/mL therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 4% mannitol, about 0.005% polysorbate 80, and has a pH of about 6. Another such formulation includes about 10 mg/mL therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 10 mM succinate, about 10 mM methionine, about 10% mannitol, about 0.005% polysorbate 80, and has a pH of about 6.5.

Still another such formulation includes about 5 mg/mL to about 20 mg/mL therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 5 mM to about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 4% mannitol, about 0.005% polysorbate 80, and has a pH of about 6.0 to about 6.5. Yet another such formulation includes about 5 mg/mL to about 20 mg/mL therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 5 mM to about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 150 mM NaCl, about 0.005% polysorbate 80, and has a pH of about 6.0 to about 6.5.

The present invention also provides a formulation suitable for intravenous administration that includes about 20 mg/mL of therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 4% mannitol and has a pH of about 6. Preferably, such formulation includes about 0.005% polysorbate 80.

The invention provides a method for increasing the stability of an antigen-binding polypeptide, for example, an antibody, in a liquid pharmaceutical formulation, where the polypeptide would otherwise exhibit by-product formation during storage in a liquid formulation. Accordingly, the method comprises incorporating into the formulation an anti-oxidant, for example, methionine or an analog thereof, in an amount sufficient to reduce the amount of by-product formation.

The present invention also provides a method for maintaining the stability of a therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof) formulation to be stored at a temperature of about  $-50^{\circ}\text{C}$  to about  $-80^{\circ}\text{C}$  followed by storage at a temperature of about  $2^{\circ}\text{C}$  to about  $8^{\circ}\text{C}$ , comprising (i) combining about 40 mg/ml to about 60 mg/ml therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 1 mg/ml to about 2 mg/ml L-histidine, about 1 mg/ml to about 2 mg/ml methionine and about 0.05 mg/ml polysorbate 80; (ii) adjusting the pH to about 6.0; (iii) filtering into a cryovessel and freezing; (iv) thawing; (v) adding mannitol or NaCl and diluent in amounts sufficient to result in a final concentration of about 4% mannitol or about 150 mM NaCl, about 2 mg/ml to about 20 mg/ml therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof); about 5 mM to about 10 mM histidine; about 10 mM methionine and about 0.005% polysorbate 80; (vi) filtering; (vii) transferring to a glass vial and sealing; and (viii) storing at a temperature of about  $2^{\circ}\text{C}$  to about  $8^{\circ}\text{C}$ .

The present invention also provides a kit including a container with a formulation described herein and instructions for use.

The present invention also provides a pharmaceutical unit dosage form, including a formulation of about 10 mg to about 250 mg of therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 4% mannitol or about 150 mM NaCl, about 5 mM to about 10 mM histidine or succinate, and about 10

mM methionine. Some of such pharmaceutical unit dosage forms include about 0.001% to about 0.1% of polysorbate 80. Some of such pharmaceutical unit dosage forms include about 40 mg to about 60 mg, about 60 mg to about 80 mg, about 80 mg to about 120 mg, about 120 mg to about 160 mg, or about 160 mg to about 240 mg of the therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof). Some of such formulations can be maintained in a glass vial at a temperature of about 2°C to about 8°C prior to administration to a patient.

In addition, the present invention provides a therapeutic product including a glass vial with a formulation including about 10 mg to about 250 mg of therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof), about 4% mannitol or about 150 mM NaCl, about 5 mM to about 10 mM histidine, and about 10 mM methionine. Some of such therapeutic products further include a labeling for use including instructions to use the appropriate volume necessary to achieve a dose of about 0.15 mg/kg to about 5 mg/kg in a patient. Typically, the vial is a 1 mL, a 2 mL, a 5 mL, a 10 mL, a 25 mL or a 50 mL vial. The dose of some of such therapeutic products is about 0.5 mg/kg to about 3 mg/kg, preferably about 1 mg/kg to about 2 mg/kg. In some such therapeutic products, the therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, antibody or antigen-binding fragment thereof) concentration is about 10 mg/ml to about 60 mg/ml, preferably about 20 mg/ml. The therapeutic product preferably includes about 0.005% polysorbate 80. The formulation of some such therapeutic products is for subcutaneous administration or intravenous administration.

In another aspect, the invention provides a method for increasing the stability of an antigen-binding polypeptide, for example, an antibody, in a liquid pharmaceutical formulation, where the polypeptide would otherwise exhibit by-product formation during storage in a liquid formulation. Accordingly, the method comprises incorporating into the formulation an anti-oxidant, for example, methionine or an analog thereof, in an amount sufficient to reduce the amount of by-product formation.

In yet another aspect, the present invention provides a kit including a container with a formulation described herein and instructions for use.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

*Figure 1* depicts a schematic representation of the predicted structure of an IgG antibody and approximate positions of intra- and inter-chain disulfide bonds, glycosylation sites (hexagonal symbol), complementarity determining regions (CDRs), framework regions (shaded), and constant regions.

*Figure 2* identifies the complete amino acid sequences of the humanized 3D6 version 2 (hu3D6.v2) anti A $\beta$  antibody light and heavy chains, SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, respectively. Light chain complementarity determining regions (CDR), *i.e.*, CDR1, CDR2, and CDR3 are, respectively, at residue positions 24-39, 55-61, and 94-102 (upper panel). Heavy chain complementarity determining regions (CDR), *i.e.*, CDR1, CDR2, and CDR3 are, respectively, at residue positions 40-44, 50-65, and 99-108 (lower panel). Predicted intramolecular disulfide bonds are illustrated by connections of the cysteine residues involved. Cysteines expected to form intermolecular disulfide bonds are underlined and the connectivity indicated. The N-linked glycosylation consensus site of the antibody heavy chain is indicated in bold italics at residue positions 299-301 (lower panel). The predicted heavy chain C-terminal lysine is shown in parenthesis.

*Figure 3* graphically depicts the shelf life predictions for antibody formulations (with and without polysorbate 80 (PS80)) made in accordance with the present invention and stored at 5°C.

*Figure 4* graphically depicts the shelf life predictions for antibody formulations (with and without PS80) made in accordance with the present invention and stored at 25°C.

*Figure 5* graphically depicts the shelf life predictions for antibody formulations (with and without PS80) made in accordance with the present invention and stored at 40°C.

*Figure 6* graphically depicts the degradation predictions of formulations with PS80 made in accordance with the present invention and stored at 5°C.

*Figure 7* graphically depicts the size exclusion chromatography (SEC) analysis of formulations with PS80 made in accordance with the present invention, stored at 5°C, and reprocessed to minimize assay variability.

*Figure 8* graphically depicts the degradation predictions of formulations without PS80 made in accordance with the present invention and stored at 5°C.

*Figure 9* depicts a chromatogram which indicates that the presence of PS80 shifts the by-products found within the stabilized polypeptide formulation from a high molecular weight species to a low molecular weight species without changing the monomer antibody profile.

*Figure 10* graphically depicts the inhibition of the formation of undesired by-products in a polypeptide formulation comprising IgG4, in particular, high molecular weight polypeptide aggregates, upon the addition of an antioxidant such as free methionine.

*Figure 11* graphically depicts the inhibition of the formation of undesired by-products in a polypeptide formulation comprising IgG2, in particular, high molecular weight polypeptide aggregates, upon the addition of an antioxidant such as free methionine.

### **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

In order to provide a clear understanding of the specification and claims, the following definitions are conveniently provided below.

As used herein, the term “antigen-binding polypeptide” includes polypeptides capable of specifically binding to a target molecule, for example, an antigen, for example, an A $\beta$  peptide(s) or to epitope(s) within said A $\beta$  peptides. Typically, antigen-binding polypeptides comprise at least a functional portion of an immunoglobulin or immunoglobulin-like domain (*e.g.*, a receptor) that comprises one or more variability regions or complementarity determining regions (CDRs) which impart a specific binding characteristic to the polypeptide. Preferred antigen-binding polypeptides include antibodies, for example, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4.

The term “antibody” includes monoclonal antibodies (including full length monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multispecific antibodies (*e.g.*, bispecific antibodies), chimeric antibodies, CDR-grafted antibodies, humanized antibodies, human antibodies, and single chain antibodies (scFvs). The term “single-chain antibody” refers to a protein having a two-polypeptide chain structure consisting of a heavy and a light chain, said chains being stabilized, for example, by interchain peptide linkers, which has the ability to specifically bind antigen. The term “antibody fragment” includes F(ab')<sub>2</sub> fragments, Fab fragments, Fd fragments, Fv fragments, and single domain antibody fragments (DABs).

The term “domain” refers to a globular region of a heavy or light chain polypeptide comprising an immunoglobulin fold. The immunoglobulin fold is comprised of  $\beta$ -pleated sheet secondary structure and includes a disulfide bond. Domains are further referred to herein as “constant” or “variable”, based on the relative lack of sequence variation within the domains of various class members in the case of a “constant” domain, or the significant variation within the domains of various class members in the case of a “variable” domain. Antibody or polypeptide “domains” are often referred to interchangeably in the art as antibody or polypeptide “regions”. The “constant” domains of an antibody light chain are referred to interchangeably as “light chain constant regions”, “light chain constant domains”, “CL” regions or “CL” domains. The “constant” domains of an antibody heavy chain are referred to interchangeably as “heavy chain constant regions”, “heavy chain constant domains”, “CH” regions or “CH” domains). The “variable” domains of an antibody light chain are referred to interchangeably as “light chain variable regions”, “light chain variable domains”, “VL” regions or “VL” domains). The “variable” domains of an antibody heavy chain are referred to interchangeably as “heavy chain constant regions”, “heavy chain constant domains”, “VH” regions or “VH” domains).

The term “region” can also refer to a part or portion of an antibody chain or antibody chain domain (*e.g.*, a part or portion of a heavy or light chain or a part or portion of a constant or variable domain, as defined herein), as well as more discrete parts or portions of said chains or domains. For example, light and heavy chains or light and heavy chain variable domains include “complementarity determining regions” or “CDRs” interspersed among “framework regions” or “FRs”, as defined herein.

The term “anti A $\beta$  antibody” includes antibodies (and fragments thereof) that are capable of binding epitopes(s) of the A $\beta$  peptide. Anti A $\beta$  antibodies include, for example, those antibodies described in U.S. Patent Publication No. 20030165496A1, U.S. Patent Publication No. 20040087777A1, International Patent Publication No. WO02/46237A3, and International Patent Publication No. WO04/080419A2. Other anti A $\beta$  antibodies are described in, *e.g.*, International Publication Nos. WO03/077858A2 and WO04/108895A2, both entitled “Humanized Antibodies that Recognize Beta Amyloid Peptide”, International Patent Publication No. WO03/016466A2, entitled “Anti-A $\beta$  Antibodies”, International Patent Publication No. WO0162801A2, entitled

“Humanized Antibodies that Sequester Amyloid Beta Peptide”, and International Patent Publication No. WO02/088306A2, entitled “Humanized Antibodies”.

The term “fragment” refers to a part or portion of an antibody or antibody chain comprising fewer amino acid residues than an intact or complete antibody or antibody chain. Fragments can be obtained *via* chemical or enzymatic treatment of an intact or complete antibody or antibody chain. Fragments can also be obtained by recombinant means. Exemplary fragments include Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, and/or Fv fragments. The term “antigen-binding fragment” refers to a polypeptide fragment of an immunoglobulin or antibody that binds antigen or competes with intact antibody (*i.e.*, with the intact antibody from which they were derived) for antigen binding (*i.e.*, specific binding).

The term “conformation” refers to the tertiary structure of a protein or polypeptide (*e.g.*, an antibody, antibody chain, domain or region thereof). For example, the phrase “light (or heavy) chain conformation” refers to the tertiary structure of a light (or heavy) chain variable region, and the phrase “antibody conformation” or “antibody fragment conformation” refers to the tertiary structure of an antibody or fragment thereof.

“Specific binding” of an antibody means that the antibody exhibits appreciable affinity for a particular antigen or epitope and, generally, does not exhibit significant cross-reactivity. In exemplary embodiments, the antibody exhibits no cross-reactivity (*e.g.*, does not cross-react with non-A $\beta$  peptides or with remote epitopes for example, non contiguous epitopes on A $\beta$ ). “Appreciable” or preferred binding includes binding with an affinity of at least  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  M<sup>-1</sup>, or  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. Affinities greater than  $10^7$  M<sup>-1</sup>, preferably greater than  $10^8$  M<sup>-1</sup> are more preferred. Values intermediate of those set forth herein are also intended to be within the scope of the present invention and a preferred binding affinity can be indicated as a range of affinities, for example,  $10^6$  to  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>, preferably  $10^7$  to  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>, more preferably  $10^8$  to  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>. An antibody that “does not exhibit significant cross-reactivity” is one that will not appreciably bind to an undesirable entity (*e.g.*, an undesirable protein, polypeptide or peptide). For example, an antibody that specifically binds to A $\beta$  will appreciably bind A $\beta$  but will not significantly react with non-A $\beta$  proteins or peptides (*e.g.*, non-A $\beta$  proteins or peptides included in plaques). An antibody specific for a particular epitope will, for example, not significantly cross-react with remote epitopes on the same protein or peptide. Specific

binding can be determined according to any art-recognized means for determining such binding. Preferably, specific binding is determined according to Scatchard analysis and/or competitive binding assays.

Binding fragments are produced by recombinant DNA techniques, or by enzymatic or chemical cleavage of intact immunoglobulins. Binding fragments include Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, single chains, and single-chain antibodies. Other than "bispecific" or "bifunctional" immunoglobulins or antibodies, an immunoglobulin or antibody is understood to have each of its binding sites identical. A "bispecific" or "bifunctional antibody" is an artificial hybrid antibody having two different heavy/light chain pairs and two different binding sites. Bispecific antibodies can be produced by a variety of methods including fusion of hybridomas or linking of Fab' fragments. See, *e.g.*, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

An "antigen" is a molecule (*e.g.*, a protein, polypeptide, peptide or carbohydrate) containing an antigenic determinant to which an antibody specifically binds.

The term "epitope" or "antigenic determinant" refers to a site on an antigen to which an immunoglobulin or antibody (or antigen binding fragment thereof) specifically binds. Epitopes can be formed both from contiguous amino acids or noncontiguous amino acids juxtaposed by tertiary folding of a protein. Epitopes formed from contiguous amino acids are typically retained on exposure to denaturing solvents, whereas epitopes formed by tertiary folding are typically lost on treatment with denaturing solvents. An epitope typically includes at least 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 or 15 amino acids in a unique spatial conformation. Methods of determining spatial conformation of epitopes include, for example, x-ray crystallography and 2-dimensional nuclear magnetic resonance. See, *e.g.*, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

The term "stabilized formulation" or "stabilized liquid polypeptide formulation" includes formulations in which the polypeptide therein essentially retains its physical and chemical identity and integrity upon storage. Various analytical techniques for measuring protein stability are available in the art and are described herein (reviewed in, *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993)). Stability can be measured at a selected temperature for a selected time period. For rapid

testing, the formulation may be kept at a higher or “accelerated” temperature, *e.g.*, 40°C for 2 weeks to 1 month or more at which time stability is measured. In exemplary embodiments, the formulation is refractory to the formation of by-products of the component polypeptide, for example, high molecular weight aggregation products, low molecular weight degradation or fragmentation products, or mixtures thereof.

The term “by-product” includes undesired products, which detract, or diminish the proportion of therapeutic polypeptide in a given formulation. Typical by-products include aggregates of the therapeutic polypeptide, fragments of the therapeutic polypeptide (*e.g.*, produced by degradation of the polypeptide by deamidation or hydrolysis), or mixtures thereof.

The term “high molecular weight polypeptide aggregates” includes aggregates of the therapeutic polypeptide, fragments of the therapeutic polypeptide (*e.g.*, produced by degradation of the polypeptide by, for example, hydrolysis), or mixtures thereof, that then aggregate. Typically, high molecular weight aggregates are complexes which have a molecular weight which is greater than the therapeutic monomer polypeptide. In the case of an antibody, for example, an IgG antibody, such aggregates are greater than about 150 kD. However, in the case of other therapeutic polypeptides, for example, single-chain antibodies, which typically have a molecular weight of 25 kD, such aggregates would have a molecular weight greater than about 25 kD.

The term “low molecular weight polypeptide degradation product” includes, for example, fragments of the therapeutic polypeptide, for example, brought about by deamidation or hydrolysis. Typically, low molecular weight degradation products are complexes which have a molecular weight which is less than the therapeutic monomer polypeptide. In the case of an antibody, for example, an IgG antibody, such degradation products are less than about 150 kD. However, in the case of other therapeutic polypeptides, for example, single-chain antibodies, which typically have a molecular weight of 25 kD, such aggregates would have a molecular weight less than about 25 kD.

The term “administration route” includes art recognized administration routes for delivering a therapeutic polypeptide such as, for example, parenterally, intravenously, intramuscularly, subcutaneously, intracranially, or epidurally. For the administration of a therapeutic polypeptide for the treatment of a neurodegenerative disease, intravenous, epidural, or intracranial routes, may be desired.

The term “amyloidogenic disease” includes any disease associated with (or caused by) the formation or deposition of insoluble amyloid fibrils. Exemplary amyloidogenic diseases include, but are not limited to systemic amyloidosis, Alzheimer’s disease, mature onset diabetes, Parkinson’s disease, Huntington’s disease, fronto-temporal dementia, and the prion-related transmissible spongiform encephalopathies (kuru and Creutzfeldt-Jacob disease in humans and scrapie and BSE in sheep and cattle, respectively). Different amyloidogenic diseases are defined or characterized by the nature of the polypeptide component of the fibrils deposited. For example, in subjects or patients having Alzheimer’s disease,  $\beta$ -amyloid protein (*e.g.*, wild-type, variant, or truncated  $\beta$ -amyloid protein) is the characterizing polypeptide component of the amyloid deposit. Accordingly, Alzheimer’s disease is an example of a “disease characterized by deposits of  $A\beta$ ” or a “disease associated with deposits of  $A\beta$ ”, *e.g.*, in the brain of a subject or patient.

The terms “ $\beta$ -amyloid protein”, “ $\beta$ -amyloid peptide”, “ $\beta$ -amyloid”, “ $A\beta$ ” and “ $A\beta$  peptide” are used interchangeably herein.

The term “treatment” as used herein, is defined as the application or administration of a therapeutic agent to a patient, or application or administration of a therapeutic agent to an isolated tissue or cell line from a patient, who has a disease, a symptom of disease or a predisposition toward a disease, with the purpose to cure, heal, alleviate, delay, relieve, alter, remedy, ameliorate, improve or affect the disease, the symptoms of disease or the predisposition toward disease.

The term “effective dose” or “effective dosage” is defined as an amount sufficient to achieve or at least partially achieve the desired effect. The term “therapeutically effective dose” is defined as an amount sufficient to cure or at least partially arrest the disease and its complications in a patient already suffering from the disease. Amounts effective for this use will depend upon the severity of the infection and the general state of the patient’s own immune system.

The term “patient” includes human and other mammalian subjects that receive either prophylactic or therapeutic treatment.

The term “dosage unit form” (or “unit dosage form”) as used herein refers to a physically discrete unit suitable as unitary dosages for the patient to be treated, each unit containing a predetermined quantity of active compound calculated to produce the

desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier, diluent, or excipient. The specification for the dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and the parameters known in the art of compounding such an active compound for the treatment of patients.

Actual dosage levels of the active ingredient (*e.g.* A $\beta$  polypeptides) in the formulations of the present invention may be varied so as to obtain an amount of the active ingredient which is effective to achieve the desired therapeutic response for a particular patient, composition, and mode of administration, without being toxic to the patient. The selected dosage level will depend upon a variety of pharmacokinetic factors including the activity of the particular compositions of the present invention employed, the route of administration, the time of administration, the rate of excretion of the particular compound being employed, the duration of the treatment, other drugs, compounds and/or materials used in combination with the particular compositions employed, the age, sex, weight, condition, general health and prior medical history of the patient being treated, and like factors well known in the medical arts.

The term "diluent" as used herein refers to a solution suitable for altering or achieving an exemplary or appropriate concentration or concentrations as described herein.

## OVERVIEW

The present invention provides formulations for antigen binding polypeptides, in particular, antibodies, as well as portions and/or fragments thereof. In certain aspects, the invention provides stabilized liquid polypeptide formulations for therapeutic use. In particular, the invention provides for the stabilization of antigen binding polypeptides, for example, antibodies, and antigen-binding fragments thereof, for the use in treating diseases and /or disorders. In particular, the invention provides formulations that are stabilized such that the active therapeutic polypeptide is stable over an extended period of time and can be administered through a variety of administration routes. This is especially critical for those antigen binding polypeptides (*e.g.*, antibodies) destined for use in the treatment of certain diseases and /or disorders, *e.g.*, neurological disease or disorder. In other aspects, the invention provides a uniquely stable antibody formulation

that, for example, is stable to various stresses such as freezing, lyophilization, heat and/or reconstitution. Moreover, exemplary formulations of the present invention are capable of maintaining the stability, biological activity, purity and quality of the antibody over an extended period of time and even at unfavorable temperatures (*e.g.*, a year during which time the formulation is stored). In addition, exemplary formulations of the present invention are suitable for administration to a subject or patient (*e.g.*, intravenous administration to a subject or patient), for example, a human having or predicted to have a neurological disease or disorder, *e.g.*, an amyloidogenic disease involving the amyloid A $\beta$  polypeptide.

#### **FORMULATIONS**

In one aspect, the present invention provides a formulation including a therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, an antibody or antigen-binding fragment thereof), a tonicity agent (*e.g.*, mannitol), where the tonicity agent is present in an amount sufficient to render the formulation suitable for intravenous infusion, and an amino acid (*e.g.*, histidine) or derivative thereof, where the amino acid or derivative thereof is present in an amount sufficient to maintain a physiologically suitable pH. In an exemplary embodiment, the present invention provides a formulation including a therapeutically active antigen-binding polypeptide (*e.g.*, an antibody or antigen-binding fragment thereof), mannitol and histidine.

In another aspect, the present invention provides a stabilized formulation including a therapeutically active antigen-binding polypeptide. Antigen-binding polypeptides suitable for stabilization in a formulation of the invention include antibodies and fragments thereof, and in particular, antibodies capable of binding a therapeutic target involved in disease or disorder. Accordingly, the therapeutic polypeptides are stabilized according to the invention to avoid the formation of by-products, typically high molecular weight aggregates, low molecule weight degradation fragments, or a mixture thereof, by the addition of an antioxidant in a sufficient amount so as to inhibit the formation of such by-products. Antioxidant agents include methionine and analogs thereof, at concentrations sufficient to obtain the desired inhibition of undesired by-products as discussed below. Optionally, the stabilized polypeptide formulations of the invention further comprise a tonicity agent (*e.g.*, mannitol), where the tonicity agent is present in an amount sufficient to render the

formulation suitable for several different routes of administration, for example, intravenous infusion, and an amino acid (e.g., histidine) or derivative thereof, where the amino acid or derivative thereof is present in an amount sufficient to maintain a physiologically suitable pH. In an exemplary embodiment, the present invention provides a formulation including a therapeutically active antigen-binding polypeptide, methionine, mannitol and histidine.

#### Polypeptides for use in the Formulations of the Invention

The polypeptide to be formulated according to the invention as described herein is prepared using techniques which are well established in the art and include, for example, synthetic techniques (such as recombinant techniques and peptide synthesis or a combination of these techniques), or may be isolated from an endogenous source of the polypeptide. In certain embodiments of the invention, the polypeptide of choice is an antigen-binding polypeptide, more preferably, an antibody, and in particular, an anti-A $\beta$  antibody. Techniques for the production of an antigen-binding polypeptide, and in particular, antibodies, are described below.

#### Antibodies

The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, *i.e.*, molecules that contain an antigen binding site which specifically binds (recognizes) an antigen. Examples of immunologically active portions of immunoglobulin molecules include F(ab) and F(ab')<sub>2</sub> fragments which can be generated by treating the antibody with an enzyme such as pepsin or produced by art-recognized recombinant engineering techniques. Embodiments of the invention are relevant for the stabilization of antibodies, for example, polyclonal and monoclonal antibodies that bind an antigen, for example a therapeutic target antigen, such as, A $\beta$ . The term "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody formulation", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one species of an antigen binding site capable of recognizing and binding to a particular epitope of a target antigen, for example, an epitope(s) of A $\beta$ . A monoclonal antibody formulation thus typically displays a single binding specificity and affinity for a particular target antigen with which it immunoreacts.

### Polyclonal Antibodies

Polyclonal antibodies can be prepared as described above by immunizing a suitable subject with an immunogen. The antibody titer in the immunized subject can be monitored over time by standard techniques, such as with an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immobilized target antigen. If desired, the antibody molecules directed against the target antigen can be isolated from the mammal (e.g., from the blood) and further purified by well known techniques, such as protein A Sepharose<sup>TM</sup> chromatography to obtain the antibody, e.g., IgG, fraction. At an appropriate time after immunization, e.g., when the anti-antigen antibody titers are highest, antibody-producing cells can be obtained from the subject and used to prepare monoclonal antibodies by standard techniques, such as the hybridoma technique originally described by Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (see also, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; and Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75). For the preparation of chimeric polyclonal antibodies, see Buechler *et al.* U.S. Patent No. 6,420,113.

### Monoclonal Antibodies

Any of the many well known protocols used for fusing lymphocytes and immortalized cell lines can be applied for the purpose of generating a monoclonal antibody (see, e.g., G. Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Gefter *et al.* *Somatic Cell Genet.*, cited *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, cited *supra*). Moreover, the ordinarily skilled worker will appreciate that there are many variations of such methods which also would be useful. Typically, the immortal cell line (e.g., a myeloma cell line) is derived from the same mammalian species as the lymphocytes. For example, murine hybridomas can be made by fusing lymphocytes from a mouse immunized with an immunogenic preparation of the present invention with an immortalized mouse cell line. Preferred immortal cell lines are mouse myeloma cell lines that are sensitive to culture medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine ("HAT medium"). Any of a number of myeloma cell lines can be used as a fusion partner according to standard techniques, e.g., the P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 or Sp2/O-Ag14 myeloma lines. These myeloma lines are available from ATCC. Typically, HAT-sensitive mouse myeloma cells are fused to

mouse splenocytes using polyethylene glycol ("PEG"). Hybridoma cells resulting from the fusion are then selected using HAT medium, which kills unfused and unproductively fused myeloma cells (unfused splenocytes die after several days because they are not transformed). Hybridoma cells producing a monoclonal antibody of the invention are detected by screening the hybridoma culture supernatants for antibodies that bind a target antigen, *e.g.*, A $\beta$ , using a standard ELISA assay.

#### Recombinant Antibodies

Alternative to preparing monoclonal antibody-secreting hybridomas, a monoclonal antibody can be identified and isolated by screening a recombinant combinatorial immunoglobulin library (*e.g.*, an antibody phage display library) with a target antigen to thereby isolate immunoglobulin library members that bind the target antigen. Kits for generating and screening phage display libraries are commercially available (*e.g.*, the Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, Catalog No. 27-9400-01; and the Stratagene *SurfZAP™ Phage Display Kit*, Catalog No. 240612). Additionally, examples of methods and reagents particularly amenable for use in generating and screening antibody display library can be found in, for example, Ladner *et al.* U.S. Patent No. 5,223,409; Kang *et al.* PCT International Publication No. WO 92/18619; Dower *et al.* PCT International Publication No. WO 91/17271; Winter *et al.* PCT International Publication WO 92/20791; Markland *et al.* PCT International Publication No. WO 92/15679; Breitling *et al.* PCT International Publication WO 93/01288; McCafferty *et al.* PCT International Publication No. WO 92/01047; Garrard *et al.* PCT International Publication No. WO 92/09690; Ladner *et al.* PCT International Publication No. WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; and McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348:552-554.

#### Chimeric and Humanized Antibodies

Additionally, recombinant antibodies, such as chimeric and humanized monoclonal antibodies, comprising both human and non-human portions, which can be made using standard recombinant DNA techniques, are within the scope of the invention.

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

The phrase "substantially from a human immunoglobulin or antibody" or "substantially human" means that, when aligned to a human immunoglobulin or antibody amino sequence for comparison purposes, the region shares at least 80-90%, 90-95%, or 95-99% identity (*i.e.*, local sequence identity) with the human framework or constant region sequence, allowing, for example, for conservative substitutions, consensus sequence substitutions, germline substitutions, backmutations, and the like. The introduction of conservative substitutions, consensus sequence substitutions, germline substitutions, backmutations, and the like, is often referred to as "optimization" of a humanized antibody or chain. The phrase "substantially from a non-human immunoglobulin or antibody" or "substantially non-human" means having an immunoglobulin or antibody sequence at least 80-95%, preferably at least 90-95%, more

preferably, 96%, 97%, 98%, or 99% identical to that of a non-human organism, *e.g.*, a non-human mammal.

Accordingly, all regions or residues of a humanized immunoglobulin or antibody, or of a humanized immunoglobulin or antibody chain, except the CDRs, are substantially identical to the corresponding regions or residues of one or more native human immunoglobulin sequences. The term "corresponding region" or "corresponding residue" refers to a region or residue on a second amino acid or nucleotide sequence which occupies the same (*i.e.*, equivalent) position as a region or residue on a first amino acid or nucleotide sequence, when the first and second sequences are optimally aligned for comparison purposes.

The term "significant identity" means that two polypeptide sequences, when optimally aligned, such as by the programs GAP or BESTFIT using default gap weights, share at least 50-60% sequence identity, preferably at least 60-70% sequence identity, more preferably at least 70-80% sequence identity, more preferably at least 80-90% identity, even more preferably at least 90-95% sequence identity, and even more preferably at least 95% sequence identity or more (*e.g.*, 99% sequence identity or more). The term "substantial identity" means that two polypeptide sequences, when optimally aligned, such as by the programs GAP or BESTFIT using default gap weights, share at least 80-90% sequence identity, preferably at least 90-95% sequence identity, and more preferably at least 95% sequence identity or more (*e.g.*, 99% sequence identity or more). For sequence comparison, typically one sequence acts as a reference sequence, to which test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are input into a computer, subsequence coordinates are designated, if necessary, and sequence algorithm program parameters are designated. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identity for the test sequence(s) relative to the reference sequence, based on the designated program parameters.

Optimal alignment of sequences for comparison can be conducted, *e.g.*, by the local homology algorithm of Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer

Group, 575 Science Dr., Madison, WI), or by visual inspection (*see generally* Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology). One example of algorithm that is suitable for determining percent sequence identity and sequence similarity is the BLAST algorithm, which is described in Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990). Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (publicly accessible through the National Institutes of Health NCBI internet server). Typically, default program parameters can be used to perform the sequence comparison, although customized parameters can also be used. For amino acid sequences, the BLASTP program uses as defaults a wordlength (W) of 3, an expectation (E) of 10, and the BLOSUM62 scoring matrix (*see* Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

Preferably, residue positions which are not identical differ by conservative amino acid substitutions. For purposes of classifying amino acids substitutions as conservative or nonconservative, amino acids are grouped as follows: Group I (hydrophobic sidechains): leu, met, ala, val, leu, ile; Group II (neutral hydrophilic side chains): cys, ser, thr; Group III (acidic side chains): asp, glu; Group IV (basic side chains): asn, gln, his, lys, arg; Group V (residues influencing chain orientation): gly, pro; and Group VI (aromatic side chains): trp, tyr, phe. Conservative substitutions involve substitutions between amino acids in the same class. Non-conservative substitutions constitute exchanging a member of one of these classes for a member of another.

Preferably, humanized immunoglobulins or antibodies bind antigen with an affinity that is within a factor of three, four, or five of that of the corresponding non-humanized antibody. For example, if the nonhumanized antibody has a binding affinity of  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , humanized antibodies will have a binding affinity of at least  $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  or  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ . When describing the binding properties of an immunoglobulin or antibody chain, the chain can be described based on its ability to "direct antigen (*e.g.*, A $\beta$ ) binding". A chain is said to "direct antigen binding" when it confers upon an intact immunoglobulin or antibody (or antigen binding fragment thereof) a specific binding property or binding affinity. A mutation (*e.g.*, a backmutation) is said to substantially affect the ability of a heavy or light chain to direct antigen binding if it affects (*e.g.*, decreases) the binding affinity of an intact immunoglobulin or antibody (or antigen binding fragment thereof) comprising said chain by at least an order of magnitude compared to that of the antibody (or antigen binding fragment thereof) comprising an

equivalent chain lacking said mutation. A mutation “does not substantially affect (*e.g.*, decrease) the ability of a chain to direct antigen binding” if it affects (*e.g.*, decreases) the binding affinity of an intact immunoglobulin or antibody (or antigen binding fragment thereof) comprising said chain by only a factor of two, three, or four of that of the antibody (or antigen binding fragment thereof) comprising an equivalent chain lacking said mutation.

The term “chimeric immunoglobulin” or antibody refers to an immunoglobulin or antibody whose variable regions derive from a first species and whose constant regions derive from a second species. Chimeric immunoglobulins or antibodies can be constructed, for example by genetic engineering, from immunoglobulin gene segments belonging to different species. The terms “humanized immunoglobulin” or “humanized antibody” are not intended to encompass chimeric immunoglobulins or antibodies, as defined *infra*. Although humanized immunoglobulins or antibodies are chimeric in their construction (*i.e.*, comprise regions from more than one species of protein), they include additional features (*i.e.*, variable regions comprising donor CDR residues and acceptor framework residues) not found in chimeric immunoglobulins or antibodies, as defined herein.

Such chimeric and humanized monoclonal antibodies can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example using methods described in Robinson *et al.* International Application No. PCT/US86/02269; Akira, *et al.* European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent Application 171,496; Morrison *et al.* European Patent Application 173,494; Neuberger *et al.* PCT International Publication No. WO 86/01533; Cabilly *et al.* U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly *et al.* European Patent Application 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; and Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, S. L. (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *BioTechniques* 4:214; Winter U.S. Patent 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; and Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Human Antibodies from Transgenic Animals and Phage Display

Alternatively, it is now possible to produce transgenic animals (e.g., mice) that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region ( $J_H$ ) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice results in the production of human antibodies upon antigen challenge. See, e.g., U.S. Patent Nos. 6,150,584; 6,114,598; and 5,770,429.

Fully human antibodies can also be derived from phage-display libraries (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)).

Bispecific Antibodies, Antibody Fusion Polypeptides, and Single-Chain Antibodies

Bispecific antibodies (BsAbs) are antibodies that have binding specificities for at least two different epitopes. Such antibodies can be derived from full length antibodies or antibody fragments (e.g. F(ab)'2 bispecific antibodies). Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditional production of full length bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two chains have different specificities (Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983)). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of different antibody molecules (see, WO 93/08829 and in Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)).

Bispecific antibodies also include cross-linked or "heteroconjugate" antibodies. For example, one of the antibodies in the heteroconjugate can be coupled to avidin, the other to biotin to biotin or other payload. Heteroconjugate antibodies may be made using any convenient cross-linking methods. Suitable cross-linking agents are well known in the art, and are disclosed in U.S. Pat. No. 4,676,980, along with a number of cross-linking techniques.

In yet another embodiment, the antibody can be fused, chemically or genetically, to a payload domain, such as a reactive, detectable, or functional moiety, for example, an immunotoxin to produce an antibody fusion polypeptide. Such payloads include, for

example, immunotoxins, chemotherapeutics, and radioisotopes, all of which are well-known in the art.

Single chain antibodies are also suitable for stabilization according to the invention. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (VH) connected to a light-chain variable domain (VL) with a linker, which allows each variable region to interface with each other and recreate the antigen binding pocket of the parent antibody from which the VL and VH regions are derived. See Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

It is understood that any of the foregoing polypeptide molecules, alone or in combination, are suitable for preparation as stabilized formulations according to the invention.

#### Therapeutic Antigen-Binding Polypeptides

A number of therapeutic antigen-binding polypeptides are suitable for being formulated according to the stabilizing conditions of the present invention. Typically, the antigen-binding polypeptides are antibodies or fragments thereof (see *supra*), that comprise an antibody variable region and/or antibody Fc region or at least a portion of an immunoglobulin, immunoglobulin superfamily protein, or receptor or receptor-like domain, that can interact with a target antigen or a molecule of the immune system, for example, an Fc receptor. For convenience, the antigen-binding polypeptides that can benefit from the methods and formulations of the present invention are discussed below according to their target antigen class. Such representative antigen-binding polypeptides bind to antigen classes that include, for example, cancer antigens, autoimmune antigens, allergens, and pathogens.

#### Therapeutic Antigen-Binding Polypeptides That Bind Cancer Antigens

In certain embodiments, the antigen-binding polypeptides subject to the methods and compositions of the present invention can bind a molecule specific for tumor cells for example, a tumor specific antigen. Such tumor specific antigens include, e.g., bullous pemphigoid antigen 2, prostate mucin antigen (PMA), tumor associated Thomsen-Friedenreich antigen, prostate-specific antigen (PSA), luminal epithelial antigen (LEA. 135) of breast carcinoma and bladder transitional cell carcinoma (TCC), cancer-associated serum antigen (CASA) and cancer antigen 125 (CA 125), the epithelial glycoprotein 40 (EGP40), squamous cell carcinoma antigen (SCC), cathepsin

E, tyrosinase in melanoma, cell nuclear antigen (PCNA) of cerebral cavernomas, DF3/MUC1 breast cancer antigen, carcinoembryonic antigen, tumor-associated antigen CA 19-9, human melanoma antigens MART-I/Melan-A27-35 and gp100, the T and Tn pancarcinoma (CA) glycopeptide epitopes, a 35 kD tumor-associated autoantigen in papillary thyroid carcinoma, KH-1 adenocarcinoma antigen, the A60 mycobacterial antigen, heat shock proteins (HSPs), mutant oncogene products, e.g., p53, ras, and HER-2/neu.

Therapeutic Antigen-Binding Polypeptides That Bind Molecules of Inflammation and Autoimmune Disease

In certain embodiments, the antigen-binding polypeptides subject to the methods and compositions of the present invention can bind a molecule responsible for inflammation or an autoimmune disease or disorder. Such antigen-binding polypeptides can bind to molecules associated with rheumatoid arthritis, SLE, diabetes mellitus, myasthenia gravis, reactive arthritis, ankylosing spondylitis, multiple sclerosis, IBD, psoriasis, pancreatitis, and various immunodeficiencies. Other target antigens include 2-GPI, 50 kDa glycoprotein, Ku (p70/p80) autoantigen, or its 80-kd subunit protein, the nuclear autoantigens La (SS-B) and Ro (SS-A), scleroderma antigens Rpp 30, Rpp 38 or Scl-70, the centrosome autoantigen PCM-1, polymyositis-scleroderma autoantigen (PM-Scl), scleroderma (and other systemic autoimmune disease) autoantigen CENP-A, U5, a small nuclear ribonucleoprotein (snRNP), the 100-kd protein of PM-Scl autoantigen, the nucleolar U3- and Th(7-2) ribonucleoproteins, the ribosomal protein L7, the 36-kd protein from nuclear matrix antigen, insulin, proinsulin, GAD65 and GAD67, heat-shock protein 65 (hsp65), and islet-cell antigen 69 (ICA69), islet cell antigen-related protein-tyrosine phosphatase (PTP), GM2-1 ganglioside, glutamic acid decarboxylase (GAD), islet cell antigen (ICA69), Tep69, the single T cell epitope recognized by T cells from diabetes patients, ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, an islet-cell protein tyrosine phosphatase and the 37-kDa autoantigen derived from it in type 1 diabetes (including IA-2, IA-2), the 64 kDa protein from In-111 cells or human thyroid follicular cells that is immunoprecipitated with sera from patients with islet cell surface antibodies (ICSA). In particular, rheumatoid arthritis antigens include 45 kDa DEK nuclear antigen, in particular onset juvenile rheumatoid arthritis and iridocyclitis, human cartilage glycoprotein-39, an autoantigen in rheumatoid arthritis, a 68 k autoantigen in

rheumatoid arthritis, collagen, collagen type II, cartilage link protein, ezrin, radixin and moesin, mycobacterial heat shock protein 65, thyroid peroxidase and the thyroid stimulating hormone receptor, thyroid peroxidase from human Graves' thyroid tissue, a 64-kDa antigen associated with thyroid-associated ophthalmopathy, the human TSH receptor, and the 64 kDa protein from In-111 cells or human thyroid follicular cells that is immunoprecipitated with sera from patients with islet cell surface antibodies.

*Therapeutic Antigen-Binding Polypeptides That Bind Allergens*

In certain embodiments, the antigen-binding polypeptides subject to the methods and compositions of the present invention can bind an allergen or molecule responsible for an allergic disease or disorder. Such antigen-binding polypeptides can bind to IgE, IgE receptors, T cell receptor (TCR), cytokines, or allergens, for example, from the house dust mite, grass pollen, birch pollen, ragweed pollen, hazel pollen, cockroach, rice, olive tree pollen, fungi, mustard, bee venom, animal allergens, e.g., from horse, dog or cat, and the like. Allergens also include latex allergens.

*Therapeutic Antigen-Binding Polypeptides That Bind Pathogens and Associated Toxins*

In certain embodiments, the antigen-binding polypeptides subject to the methods and compositions of the present invention can bind a pathogen, for example, a bacterial, fungal, or viral pathogen, or, for example, a toxin thereof. Such antigen-binding polypeptides bind to pathogens (or toxins thereof) that include Yersinia, e.g., Yersinia pestis, the causative agent of plague, in particular the V antigen, Bacillus anthracis, the causative agent of anthrax, in particular, the anthrax protective antigen (PA) or lethal factor (LF), Staphylococcus, e.g., S. aureus and S. epidermidis, and Streptococcus and/or their associated toxins, E. coli, for example, strain O-157:H7 that causes food-borne illness; Cholera bacterium, e.g., Vibrio cholerae, or enterotoxin thereof; Helicobacter pylori, e.g., antigens CagA and VacA; Chlamydia; Neisseria gonorrhoeae; and Neisseria meningitidis; Bordetella pertussis; Brucella abortus; meningococcal antigens; pneumococcal antigens; Listeria monocytogenes; Salmonella; Shigella and Mycobacterium tuberculosis; viral pathogens, e.g., Hanta virus, flaviviruses, influenza; HIV, e.g., antigens Gag, Pol, Vif and Nef; rotavirus; herpes simplex virus-type I/II; Hepatitis A, B, C, or G; rabies; papillomavirus; Epstein-Barr virus (EBV); measles; CMV; and parasites.

### Anti A $\beta$ Antibodies

Generally, the formulations of the present invention include a variety of antibodies for treating amyloidogenic diseases, in particular, Alzheimer's Disease, by targeting A $\beta$  peptide.

The terms "A $\beta$  antibody", "anti A $\beta$  antibody" and "anti A $\beta$ " are used interchangeably herein to refer to an antibody that binds to one or more epitopes or antigenic determinants of the human amyloid precursor protein (APP), A $\beta$  protein, or both. Exemplary epitopes or antigenic determinants can be found within APP, but are preferably found within the A $\beta$  peptide of APP. Multiple isoforms of APP exist, for example APP<sup>695</sup>, APP<sup>751</sup> and APP<sup>770</sup>. Amino acids within APP are assigned numbers according to the sequence of the APP<sup>770</sup> isoform (see *e.g.*, GenBank Accession No. P05067). Examples of specific isoforms of APP which are currently known to exist in humans are the 695 amino acid polypeptide described by Kang *et al.* (1987) *Nature* 325:733-736 which is designated as the "normal" APP; the 751 amino acid polypeptide described by Ponte *et al.* (1988) *Nature* 331:525-527 (1988) and Tanzi *et al.* (1988) *Nature* 331:528-530; and the 770-amino acid polypeptide described by Kitaguchi *et al.* (1988) *Nature* 331:530-532. As a result of proteolytic processing of APP by different secretase enzymes *in vivo* or *in situ*, A $\beta$  is found in both a "short form", 40 amino acids in length, and a "long form", ranging from 42-43 amino acids in length. The short form, A $\beta$ <sub>40</sub>, consists of residues 672-711 of APP. The long form, *e.g.*, A $\beta$ <sub>42</sub> or A $\beta$ <sub>43</sub>, consists of residues 672-713 or 672-714, respectively. Part of the hydrophobic domain of APP is found at the carboxy end of A $\beta$ , and may account for the ability of A $\beta$  to aggregate, particularly in the case of the long form. A $\beta$  peptide can be found in, or purified from, the body fluids of humans and other mammals, *e.g.* cerebrospinal fluid, including both normal individuals and individuals suffering from amyloidogenic disorders.

The terms " $\beta$ -amyloid protein", " $\beta$ -amyloid peptide", " $\beta$ -amyloid", "A $\beta$ " and "A $\beta$  peptide" are used interchangeably herein. A $\beta$  peptide (*e.g.*, A $\beta$ <sub>39</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub>, A $\beta$ <sub>41</sub>, A $\beta$ <sub>42</sub> and A $\beta$ <sub>43</sub>) is a ~4-kDa internal fragment of 39-43 amino acids of APP. A $\beta$ <sub>40</sub>, for example, consists of residues 672-711 of APP and A $\beta$ <sub>42</sub> consists of residues 672-713 of APP. A $\beta$  peptides include peptides resulting from secretase cleavage of APP and synthetic peptides having the same or essentially the same sequence as the cleavage

products. A $\beta$  peptides can be derived from a variety of sources, for example, tissues, cell lines, or body fluids (*e.g.* sera or cerebrospinal fluid). For example, an A $\beta$  can be derived from APP-expressing cells such as Chinese hamster ovary (CHO) cells stably transfected with APP<sub>717V→F</sub>, as described, for example, in Walsh *et al.*, (2002), *Nature*, 416, pp 535-539. An A $\beta$  preparation can be derived from tissue sources using methods previously described (*see, e.g.*, Johnson-Wood *et al.*, (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1550). Alternatively, A $\beta$  peptides can be synthesized using methods which are well known to those in the art. See, for example, Fields *et al.*, *Synthetic Peptides: A User's Guide*, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., New York, NY, 1992, p 77). Hence, peptides can be synthesized using the automated Merrifield techniques of solid phase synthesis with the  $\alpha$ -amino group protected by either t-Boc or F-moc chemistry using side chain protected amino acids on, for example, an Applied Biosystems Peptide Synthesizer Model 430A or 431. Longer peptide antigens can be synthesized using well known recombinant DNA techniques. For example, a polynucleotide encoding the peptide or fusion peptide can be synthesized or molecularly cloned and inserted in a suitable expression vector for the transfection and heterologous expression by a suitable host cell. A $\beta$  peptide also refers to related A $\beta$  sequences that results from mutations in the A $\beta$  region of the normal gene.

The term "epitope" or "antigenic determinant" refers to a site on an antigen to which an immunoglobulin or antibody (or antigen binding fragment thereof) specifically binds. Exemplary epitopes or antigenic determinants to which an A $\beta$  antibody binds can be found within the human amyloid precursor protein (APP), but are preferably found within the A $\beta$  peptide of APP. Exemplary epitopes or antigenic determinants within A $\beta$  are located within the N-terminus, central region, or C-terminus of A $\beta$ . An "N-terminal epitope", is an epitope or antigenic determinant located within the N-terminus of the A $\beta$  peptide. Exemplary N-terminal epitopes include residues within amino acids 1-10 or 1-12 of A $\beta$ , preferably from residues 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 2-6, 2-7, 3-6, or 3-7 of A $\beta$ 42. Other exemplary N-terminal epitopes start at residues 1-3 and end at residues 7-11 of A $\beta$ . Additional exemplary N-terminal epitopes include residues 2-4, 5, 6, 7 or 8 of A $\beta$ , residues 3-5, 6, 7, 8 or 9 of A $\beta$ , or residues 4-7, 8, 9 or 10 of A $\beta$ 42. "Central" epitopes are epitopes or antigenic determinants comprising residues located within the central or mid-portion of the A $\beta$  peptide. Exemplary central epitopes include residues within

amino acids 13-28 of A $\beta$ , preferably from residues 14-27, 15-26, 16-25, 17-24, 18-23, or 19-22 of A $\beta$ . Other exemplary central epitopes include residues within amino acids 16-24, 16-23, 16-22, 16-21, 18-21, 19-21, 19-22, 19-23, or 19-24 of A $\beta$ . "C-terminal" epitopes or antigenic determinants are located within the C-terminus of the A $\beta$  peptide and include residues within amino acids 33-40, 33-41, or 33-42 of A $\beta$ . Additional exemplary C-terminal epitopes or antigenic determinants include residues 33-40 of A $\beta$ .

When an antibody is said to bind to an epitope within specified residues, such as A $\beta$  3-7, what is meant is that the antibody specifically binds to a polypeptide containing the specified residues (*i.e.*, A $\beta$  3-7 in this an example). Such an antibody does not necessarily contact every residue within A $\beta$  3-7. Nor does every single amino acid substitution or deletion within A $\beta$  3-7 necessarily significantly affect binding affinity. In various embodiments, an A $\beta$  antibody is end-specific. As used herein, the term "end-specific" refers to an antibody which specifically binds to the N-terminal or C-terminal residues of an A $\beta$  peptide but that does not recognize the same residues when present in a longer A $\beta$  species comprising the residues or in APP. In various embodiments, an A $\beta$  antibody is "C-terminus-specific." As used herein, the term "C terminus-specific" means that the antibody specifically recognizes a free C-terminus of an A $\beta$  peptide. Examples of C terminus-specific A $\beta$  antibodies include those that: recognize an A $\beta$  peptide ending at residue 40 but do not recognize an A $\beta$  peptide ending at residue 41, 42, and/or 43; recognize an A $\beta$  peptide ending at residue 42 but do not recognize an A $\beta$  peptide ending at residue 40, 41, and/or 43; etc.

In one embodiment, the A $\beta$  antibody may be a 3D6 antibody or variant thereof, or a 10D5 antibody or variant thereof, both of which are described in U.S. Patent Publication No. 20030165496A1, U.S. Patent Publication No. 20040087777A1, International Patent Publication No. WO02/46237A3 and International Patent Publication No. WO04/080419A2. Description of 3D6 and 10D5 antibodies can also be found, for example, in International Patent Publication No. WO02/088306A2 and International Patent Publication No. WO02/088307A2. Additional 3D6 antibodies are described in U.S. Patent Application No. 11/303,478 and International Application No. PCT/US05/45614. 3D6 is a monoclonal antibody (mAb) that specifically binds to an N-terminal epitope located in the human  $\beta$ -amyloid peptide, specifically, residues 1-5. By comparison, 10D5 is a mAb that specifically binds to an N-terminal epitope located in

the human  $\beta$ -amyloid peptide, specifically, residues 3-6. In another embodiment, the antibody may be a 12B4 antibody or variant thereof, as described in U.S. Patent Publication No. 20040082762A1 and International Patent Publication No. WO03/077858A2. 12B4 is a mAb that specifically binds to an N-terminal epitope located in the human  $\beta$ -amyloid peptide, specifically, residues 3-7. In yet another embodiment, the antibody may be a 12A11 antibody or a variant thereof, as described in U.S. Patent Publication No. 20050118651A1 and International Patent Publication No. WO04/10885A2. 12A11 is a mAb that specifically binds to an N-terminal epitope located in the human  $\beta$ -amyloid peptide, specifically, residues 3-7. In yet another embodiment, the antibody may be a 15C11 antibody or variant thereof, as described in U.S. Patent Application No. 11/304,986 and International Patent Application No. PCT/US05/45515 entitled "Humanized Antibodies that Recognize Beta Amyloid Peptide." 15C11 is a mAb that specifically binds to a central epitope located in the human  $\beta$ -amyloid peptide, specifically, residues 19-22. In yet another embodiment, the antibody may be a 266 antibody as described in U.S. Patent Publication No. 20050249725A1, and International Patent Publication No. WO01/62801A2. Antibodies designed to specifically bind to C-terminal epitopes located in human  $\beta$ -amyloid peptide, for use in the present invention include, but are not limited to, 369.2B, as described in U.S. Patent No. 5,786,160.

Antibodies for use in the present invention may be recombinantly or synthetically produced. For example, the antibody may be produced by a recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cell culture process. In addition, antibodies with minor modifications that retain the primary functional property of binding A $\beta$  peptide are contemplated by the present invention. In a particular embodiment, the antibody is a humanized anti A $\beta$  peptide 3D6 antibody that selectively binds A $\beta$  peptide. More specifically, the humanized anti A $\beta$  peptide 3D6 antibody is designed to specifically bind to an NH<sub>2</sub>-terminal epitope located in the human  $\beta$ -amyloid 1-40 or 1-42 peptide found in plaque deposits in the brain (e.g., in patients suffering from Alzheimer's disease).

Figure 1 provides a schematic representation of the predicted structure of an exemplary humanized anti A $\beta$  peptide 3D6 antibody termed h3D6v2. The complete amino acid sequences of the h3D6v2 light and heavy chains predicted from the DNA sequences of the corresponding expression vectors are shown in Figure 2 (where the residues are numbered starting with the NH<sub>2</sub>-terminus of light and heavy chains as

residue number 1). The last amino acid residue encoded by the heavy chain DNA sequence, Lys<sup>449</sup>, has not been observed in the mature, secreted form of h3D6v2 and, without wishing to be bound to any particular theory, is presumably removed during intracellular processing by CHO cellular proteases. Therefore, the COOH-terminus of the h3D6v2 heavy chain is optionally Gly<sup>448</sup>. COOH-terminal lysine processing has been observed in recombinant and plasma-derived antibodies and does not appear to impact their function (Harris (1995) *J. Chromatogr. A.* 705:129-134). Purified h3D6v2 is post-translationally modified by addition of N-linked glycans to the Fc portion of heavy chain, which is known to contain a single N-glycosylation consensus site. The N-glycosylation site displays three major complex biantennary neutral oligosaccharide structures commonly observed at the analogous N-glycosylation site of mammalian IgG proteins.

Another exemplary humanized anti A $\beta$  peptide antibody is humanized 3D6 version 1 (hu3D6v1) having the sequence set forth in Figure 2 but for a D $\rightarrow$  Y substitution at position 1 of the light chain.

In various embodiments of the present invention, the anti A $\beta$  antibody (e.g., a humanized anti A $\beta$  peptide 3D6 antibody) is present from about 0.1 mg/ml to about 100 mg/ml, from about 0.1 mg/ml to about 75 mg/ml, from about 0.1 mg/ml to about 50 mg/ml, from about 0.1 mg/ml to about 60 mg/ml, from about 0.1 mg/ml to about 40 mg/ml, from about 0.1 mg/ml to about 30 mg/ml, from about 10 mg/ml to about 20 mg/ml, from about 20 mg/ml to 30 mg/ml, or higher, for example, up to about 100 mg/ml, about 200 mg/ml, about 500 mg/ml, or about 1000 mg/ml or more. In various embodiments, the anti A $\beta$  antibody is present at about 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 or 25 mg/ml. In a particular embodiment, the antibody (e.g., a humanized anti A $\beta$  peptide 3D6 antibody) is present at about 17 mg/ml. In another particular embodiment, the antibody (e.g., a humanized anti A $\beta$  peptide 3D6 antibody) is present at about 20 mg/ml. In another particular embodiment, the antibody (e.g., a humanized anti A $\beta$  peptide 3D6 antibody) at about 30 mg/ml. Ranges intermediate to the above recited concentrations, e.g., about 12 mg/ml to about 17 mg/ml, are also intended to be part of this invention. For example, ranges of values using a combination of any of the above recited values as upper and/or lower limits are intended to be included.

#### Excipients

In various embodiments, the present invention provides a formulation that may include various excipients, including, but not limited to, buffer, anti-oxidant, a tonicity agent, and a stabilizer. In addition, the formulations may contain an agent for pH adjustment (*e.g.*, HCl) and a diluent (*e.g.*, water). In part, the excipients serve to, in part, maintain stability and the biological activity of the antibody (*e.g.*, by maintaining the proper conformation of the protein), and/or to maintain pH.

#### Buffering Agent

In various aspects of the present invention, the formulation includes a buffering agent (buffer). The buffer can serve to enhance isotonicity and chemical stability of the formulation. In addition, the buffer serves to maintain a physiologically suitable pH (*e.g.*, a pH of about 6.0). Generally, the formulation should have a physiologically suitable pH. In various embodiments of the present invention, the formulation should have a pH of about 5 to about 7 or from about 5.5 to about 6.5. In a particular embodiment, the formulation has a pH of about 6. Ranges intermediate to the above recited pH levels, *e.g.*, about pH 5.2 to about pH 6.3 (*e.g.*, pH 6.2), are also intended to be part of this invention. For example, ranges of values using a combination of any of the above recited values as upper and/or lower limits are intended to be included. The pH may be adjusted as necessary by techniques known in the art. For example, HCl may be added as necessary to adjust the pH to desired levels or different forms of histidine may be added as necessary to adjust the pH to desired levels.

The buffer may include, but is not limited to, succinate (sodium or phosphate), histidine, phosphate (sodium or potassium), Tris (tris (hydroxymethyl) aminomethane), diethanolamine, citrate, other organic acids and mixtures thereof. In a particular embodiment, the buffer is histidine (*e.g.*, L-histidine). In another particular embodiment, the buffer is succinate. In another embodiment, the formulation includes an amino acid such as histidine that is present in an amount sufficient to maintain the formulation at a physiologically suitable pH. Histidine is an exemplary amino acid having buffering capabilities in the physiological pH range. Histidine derives its buffering capabilities from its imidazole group. In one exemplary embodiment, the buffer is L-histidine (base) (*e.g.*  $C_6H_9N_3O_2$ , FW: 155.15). In another embodiment, the buffer is L-histidine monochloride monohydrate (*e.g.*  $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$ , FW:

209.63). In another exemplary embodiment, the buffer is a mixture of L-histidine (base) and L-histidine monochloride monohydrate.

In one embodiment, the buffer (*e.g.*, L-histidine or succinate) is present from about 0.1 mM to about 50 mM, from about 0.1 mM to about 40 mM, from about 0.1 mM to about 25 mM, from about 0.1 mM to about 30 mM, from about 0.1 mM to about 20 mM, or from about 5 mM to about 15 mM, preferably about 5 mM or 10 mM. In various embodiments, the buffer may be present at about 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, or 15 mM. In a particular embodiment, the buffer is present at about 10 mM. Ranges intermediate to the above recited concentrations, *e.g.*, about 12 mM to about 17 mM, are also intended to be part of this invention. For example, ranges of values using a combination of any of the above recited values as upper and/or lower limits are intended to be included. In certain embodiments, the buffer is present in an amount sufficient to maintain a physiologically suitable pH.

#### Tonicity Agent

In various aspects of the present invention, the formulation includes a tonicity agent. In part, the tonicity agent contributes to maintaining the isotonicity of the formulation, and to maintaining protein levels. In part, the tonicity agent contributes to preserving the level, ratio, or proportion of the therapeutically active polypeptide present in the formulation. As used herein, the term "tonicity" refers to the behavior of biologic components in a fluid environment or solution. Isotonic solutions possess the same osmotic pressure as blood plasma, and so can be intravenously infused into a subject without changing the osmotic pressure of the subject's blood plasma. Indeed, in one embodiment according to the invention, tonicity agent is present in an amount sufficient to render the formulation suitable for intravenous infusion. Often, the tonicity agent serves as a bulking agent as well. As such, the agent may allow the protein to overcome various stresses such as freezing and shear.

The tonicity agent may include, but is not limited to,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ , lactose, sorbitol, sucrose, mannitol, trehalose, raffinose, polyethylene glycol, hydroxyethyl starch, glycine and mixtures thereof. In a particular embodiment, the tonicity agent is mannitol (*e.g.*, D-mannitol, *e.g.*,  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ , FW: 182.17).

In one embodiment, the tonicity agent (*e.g.*, mannitol) is present at about 2% to about 6% w/v, or about 3% to about 5% w/v. In another embodiment, the tonicity agent is present at about 3.5% to about 4.5% w/v. In another embodiment, the tonicity agent is present at about 20mg/ml to about 60 mg/ml, at about 30 mg/ml to about 50 mg/ml, or at about 35 mg/ml to about 45 mg/ml. In a particular embodiment, the tonicity agent is present at about 4% w/v or at about 40 mg/ml. In another particular embodiment, the tonicity agent is present at about 6% w/v. In yet another particular embodiment, the tonicity agent is present at about 10% w/v.

Ranges intermediate to the above recited concentrations, *e.g.*, about 3.2% to about 4.3% w/v or about 32 to about 43 mg/ml, are also intended to be part of this invention. For example, ranges of values using a combination of any of the above recited values as upper and/or lower limits are intended to be included. The tonicity agent should be present in a sufficient amount so as to maintain tonicity of the formulation.

#### Anti-oxidant

In various aspects of the present invention, the formulation includes an anti-oxidant so as to, in part, preserve the formulation (*e.g.*, by preventing oxidation).

The anti-oxidant may include, but is not limited to, GLA (gamma-linolenic acid)-lipoic acid, DHA (docosahexaenoic acid)-lipoic acid, GLA-tocopherol, di-GLA-3,3'-thiodipropionic acid and in general any of, for example, GLA, DGLA (dihomo-gamma-linolenic acid), AA (arachidonic acid), SA (salicylic acid), EPA (eicosapentaenoic acid) or DHA (docosahexaenoic acid) with any natural or synthetic anti-oxidant with which they can be chemically linked. These include phenolic anti-oxidants (*e.g.*, eugenol, carnosic acid, caffeic acid, BHT (butylated hydroxyanisol), gallic acid, tocopherols, tocotrienols and flavenoid anti-oxidants (such as myricetin and fisetin)), polyenes (*e.g.*, retinoic acid), unsaturated sterols (*e.g.*,  $\Delta^5$ -avenosterol), organosulfur compounds (*e.g.*, allicin), terpenes (*e.g.*, geraniol, abietic acid) and amino acid antioxidants (*e.g.*, methionine, cysteine, carnosine). In one embodiment, the anti-oxidant is ascorbic acid. In a particular embodiment, the anti-oxidant is methionine, or an analog thereof, *e.g.*, selenomethionine, hydroxy methyl butanoic acid, ethionine, or trifluoromethionine.

In one embodiment, the anti-oxidant (e.g., a methionine such as L-methionine, e.g.  $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , FW=149.21) is present from about 0.1 mM to about 50 mM, from about 0.1 mM to about 40 mM, from about 0.1 mM to about 30 mM, from about 0.1 mM to about 20 mM, or from about 5 mM to about 15 mM. In various embodiments, the anti-oxidant may be present at about 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, or 15 mM. In a particular embodiment, the anti-oxidant is present at about 10 mM. In another particular embodiment, the anti-oxidant is present at about 15 mM. Ranges intermediate to the above recited concentrations, e.g., about 12 mM to about 17 mM, are also intended to be part of this invention. For example, ranges of values using a combination of any of the above recited values as upper and/or lower limits are intended to be included. In certain embodiments, the anti-oxidant should be present in a sufficient amount so as to preserve the formulation, in part, by preventing oxidation.

#### Stabilizer

In various aspects of the present invention, the formulation includes a stabilizer, also known as a surfactant. Stabilizers are specific chemical compounds that interact and stabilize biological molecules and/or general pharmaceutical excipients in a formulation. In certain embodiments, stabilizers may be used in conjunction with lower temperature storage. Stabilizers generally protect the protein from air/solution interface induced stresses and solution/surface induced stresses, often resulting in protein aggregation.

The stabilizer may include, but is not limited to, glycerin, polysorbates such as polysorbate 80, dicarboxylic acids, oxalic acid, succinic acid, adipic acid, fumaric acid, phthalic acids, and combinations thereof. In a particular embodiment the stabilizer is polysorbate 80.

In one embodiment, the stabilizer (e.g., polysorbate 80) is present between about 0.001% w/v to about 0.01% w/v, between about 0.001% w/v to about 0.009% w/v, or between about 0.003% w/v to about 0.007% w/v. In a particular embodiment, the stabilizer is present at about .005% w/v of the formulation. In another particular embodiment, the stabilizer is present at about 0.01% w/v. Ranges intermediate to the above recited concentrations, e.g., about 0.002% w/v to about 0.006% w/v, are also intended to be part of this invention. For example, ranges of values using a combination

of any of the above recited values as upper and/or lower limits are intended to be included. The stabilizer should be present in a sufficient amount so as to stabilize the A $\beta$  binding polypeptide (*e.g.*, anti A $\beta$  antibody).

Other pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers such as those described in Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>th</sup> edition, Osol, A. Ed. (1980) may be included in the formulation provided that they do not adversely affect the desired characteristics of the formulation. In a particular embodiment, the formulation is substantially free of preservatives, although, in alternative embodiments, preservatives may be added as necessary. For example, cryoprotectants or lyoprotectants may be included, for example, should the formulation be lyophilized.

In various aspects of the present invention, the formulations optionally include some or all of the classes of excipients described above. In one aspect, the formulations of the present invention include an antigen-binding polypeptide (*e.g.*, anti A $\beta$  antibody, mannitol and histidine. In particular embodiments, the formulations may include an anti-oxidant such as methionine, and/or a stabilizer such as polysorbate 80. In certain embodiments, the formulations have a pH of about 6. In another aspect, the formulation includes an antigen-binding polypeptide (*e.g.*, an anti A $\beta$  antibody), mannitol, histidine and methionine. In yet another aspect, the formulation includes an A $\beta$  binding polypeptide (*e.g.*, an anti A $\beta$  antibody), mannitol, histidine, methionine and polysorbate 80. In a particular aspect of the invention, the formulation includes about 20 mg/ml an A $\beta$  binding polypeptide (*e.g.*, an anti A $\beta$  antibody), 10 mM histidine, 10 mM methionine, 4% mannitol and has a pH of about 6. In another aspect of the invention, the formulation includes about 20 mg/ml A $\beta$  binding polypeptide (*e.g.*, anti A $\beta$  antibody), 10 mM histidine, 10 mM methionine, 4% w/v mannitol, 0.01% w/v polysorbate 80 and has a pH of about 6. In another aspect of the invention, the formulation includes about 20 mg/ml A $\beta$  binding polypeptide (*e.g.*, anti A $\beta$  antibody), 10 mM histidine, 10 mM methionine, 4% w/v mannitol, 0.005% w/v polysorbate 80 and has a pH of about 6.

Exemplary embodiments of the present invention provide concentrated preparations of an antigen-binding polypeptide (*e.g.*, anti A $\beta$  antibody), often useful as bulk drug product. Furthermore, exemplary embodiments of the present invention are stable to freezing, lyophilization and/or reconstitution. Moreover, exemplary embodiments of the present invention are stable over extended periods of time. For

example, the formulations of the present invention are stable for at least about 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, or 30 months. In particular embodiments, the formulations of the present invention are stable for at least about 12 months, for at least about 18 months, for at least about 24 months, or for at least about 30 months.

According to the invention, the formulation may be stored at temperatures from about -80°C to about 40°C, from about 0°C to about 25°C, from about 0°C to about 15°C, or from about 0°C to about 10°C, preferably from about 2°C to about 8°C. In various embodiments, the formulation may be stored at about 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C or 10°C. In a particular embodiment, the formulation is stored at about 5°C. Generally, the formulation is stable and retains biological activity at these ranges. Ranges intermediate to the above recited temperatures, *e.g.*, from about 2°C to about 17°C, are also intended to be part of this invention. For example, ranges of values using a combination of any of the above recited values as upper and/or lower limits are intended to be included.

The formulations of the present invention are suitable for delivery by a variety of techniques. In certain embodiments, the formulation is administered parenterally, such as intravenously or intramuscularly. Additionally, one may target delivery of the formulation to the brain (*e.g.*, so that the antibody may cross the blood brain barrier) or the spinal fluid. In a particular embodiment, the formulation is administered intravenously.

Effective doses of the formulations of the present invention vary depending upon many different factors, including means of administration, target site, physiological state of the patient, whether the patient is human or an animal, other medications administered, and whether treatment is prophylactic or therapeutic. Usually, the patient is a human but non-human mammals including transgenic mammals can also be treated. Treatment dosages need to be titrated to optimize safety and efficacy.

For passive immunization with an antibody, exemplary dosages range from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually from about 0.01 to about 5 mg/kg, about 0.15 mg/kg to about 3 mg/kg, about 0.5 mg/kg to about 2 mg/kg, preferably about 1 mg/kg to about 2 mg/kg of the host body weight. For example dosages can be 1 mg/kg body weight or 20 mg/kg body weight or within the range of 1-20 mg/kg, preferably about 1 mg/kg, about 2 mg/kg, about 5 mg/kg, about 10 mg/kg, or about 15 mg/kg. In other

exemplary embodiments, dosages can be at least 0.5 mg/kg (e.g. 0.5, 0.6, 0.7, 0.75, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.25, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.75, 1.8, 1.9, or 2.0 mg/kg), at least 0.75 mg/kg, at least 1.25 mg/kg, at least 1.5mg/kg, at least 1.75 mg/kg, or at least 2 mg/kg. Subjects can be administered such doses daily, on alternative days, weekly or according to any other schedule determined by empirical analysis. An exemplary treatment entails administration in multiple dosages over a prolonged period, for example, of at least six months. Additional exemplary treatment regimes entail administration once per every two weeks or once a month or once every 3 to 6 months. Exemplary dosage schedules include 1-10 mg/kg or 15 mg/kg on consecutive days, 30 mg/kg on alternate days or 60 mg/kg weekly. In some methods, two or more monoclonal antibodies with different binding specificities are administered simultaneously, in which case the dosage of each antibody administered falls within the ranges indicated.

Antibody is usually administered on multiple occasions. Intervals between single dosages can be weekly, monthly or yearly. Intervals can also be irregular as indicated by measuring blood levels of antibody to A $\beta$  in the patient. In some methods, dosage is adjusted to achieve a plasma antibody concentration of 1-1000  $\mu$ g/ml and in some methods 25-300  $\mu$ g/ml. Alternatively, antibody can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required. Dosage and frequency vary depending on the half-life of the antibody in the patient. In general, human antibodies show the longest half-life, followed by humanized antibodies, chimeric antibodies, and nonhuman antibodies.

The dosage and frequency of administration can vary depending on whether the treatment is prophylactic or therapeutic. In prophylactic applications, formulations containing the present antibodies or a cocktail thereof are administered to a patient not already in the disease state to enhance the patient's resistance. Such an amount is defined to be a "prophylactic effective dose." In this use, the precise amounts again depend upon the patient's state of health and general immunity, but generally range from 0.1 to 25 mg per dose, especially 0.5 to 2.5 mg per dose. A relatively low dosage is administered at relatively infrequent intervals over a long period of time. Some patients continue to receive treatment for the rest of their lives.

In therapeutic applications, a relatively high dosage (e.g., from about 0.5 or 1 to about 200 mg/kg of antibody per dose (e.g. 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10, 20, 25, 50, or 100

mg/kg), with dosages of from 5 to 25 mg/kg being more commonly used) at relatively short intervals is sometimes required until progression of the disease is reduced or terminated, and preferably until the patient shows partial or complete amelioration of symptoms of disease. Thereafter, the patent can be administered a prophylactic regime.

It may be useful to provide the formulations of the invention in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Formulations of the invention may be presented in capsules, ampules or in multi-dose containers. The unit dosage form may comprise any formulation described herein including suspensions, solutions or emulsions of the active ingredient together with formulating agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. In an exemplary embodiment, the pharmaceutical dosage unit form may be added to or reconstituted in an intravenous drip bag (e.g. a 50 ml, 100 ml, or 250 ml, or 500 ml drip bag) with a suitable diluent, e.g., sterile pyrogen-free water or saline solution, before administration to the patient, for example, by intravenous infusion. Some pharmaceutical unit dosage forms may require reconstitution with a suitable diluent prior to addition to an intravenous drip bag, particularly lyophilized forms. In exemplary embodiments, the pharmaceutical unit dosage form is a container containing a formulation described herein. The term "container" refers to something, for example, a holder, receptacle, or vessel, into which an object or liquid can be placed or contained, for example, for storage. For example, the container may be a 10 mL glass, type I, tubing vial. Generally, the container should maintain the sterility and stability of the formulation. For example, the vial may be closed with a serum stopper. Furthermore, in various embodiments, the container should be designed so as to allow for withdrawal of 100 mg of formulation or active ingredient (e.g., for single use). Alternatively, the container may be suitable for larger amounts of formulation or active ingredient, for example, from about 10 mg to about 5000 mg, from about 100 mg to about 1000 mg, and from about 100 mg to about 500 mg, about 40 mg to about 250 mg, about 60 mg to about 80 mg, about 80 mg to about 120 mg, about 120 mg to about 160 mg, or ranges or intervals thereof, e.g., about 100 mg to about 200 mg. Ranges intermediate to the above recited amounts, e.g., from about 25 mg to about 195 mg, are also intended to be part of this invention. For example, ranges of values using a combination of any of the above recited values as upper and/or lower limits are intended to be included. In a particular embodiment, the formulation often is supplied as a liquid in unit dosage form.

In another aspect, the present invention provides a kit including a pharmaceutical dosage unit form (for example, a container with a formulation disclosed herein), and instructions for use. Accordingly, the container and the kit may be designed to provide enough formulation for multiple uses. In various embodiments, the kit may further include diluent. The diluent may include excipients, separate or combined. For example, the diluent may include a tonicity modifier such as mannitol, a buffering agent such as histidine, a stabilizer such as polysorbate 80, an anti-oxidant such as methionine, and/or combinations thereof. The diluent may contain other excipients, for example, lyoprotectant, as deemed necessary by one skilled in the art.

Additional useful embodiments of the invention are set forth in the section of this application entitled "Summary of the Invention".

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

## EXAMPLES

Throughout the examples, the following materials and methods were used unless otherwise stated.

### *Materials and Methods*

In general, the practice of the present invention employs, unless otherwise indicated, conventional techniques of chemistry, molecular biology, recombinant DNA technology, immunology (especially, *e.g.*, antibody technology), and standard techniques of polypeptide preparation. See, *e.g.*, Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning*: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow *et al.*, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); and Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992).

## EXAMPLE 1

### CLONING AND EXPRESSION OF A THERAPEUTIC POLYPEPTIDE

In this example, the cloning and expression of a therapeutic polypeptide, in particular, an antigen-binding polypeptide, that is, an antibody capable of binding A $\beta$ , is described.

An exemplary antibody for formulation according to the methods of the instant invention is 3D6. The 3D6 mAb is specific for the N-terminus of A $\beta$  and has been shown to mediate phagocytosis (*e.g.*, induce phagocytosis) of amyloid plaque. 3D6 does not recognize secreted APP or full-length APP, but detects only A $\beta$  species with an amino-terminal aspartic acid. Therefore, 3D6 is an end-specific antibody. The cell line designated RB96 3D6.32.2.4 producing the antibody 3D6 has the ATCC accession number PTA-5130, having been deposited on Apr. 8, 2003. The cloning, characterization and humanization of 3D6 antibody is described in U.S. Patent Application Publication No. 20030165496 A1.

Briefly, humanization of the anti A $\beta$  peptide murine monoclonal antibody (designated as m3D6) was carried out by isolating the DNA sequences for m3D6 light chain and heavy chain variable regions ( $V_L$  and  $V_H$ ) by reverse transcription - polymerase

chain reaction (RT-PCR). Based on the determined m3D6  $V_L$  and  $V_H$  DNA sequences, homologous human framework regions were identified. To insure that the humanized antibody retained the ability to interact with the A $\beta$  peptide antigen, critical murine  $V_L$  and  $V_H$  framework residues were retained in the humanized 3D6 sequence to preserve the overall structure of the constant domain regions (CDRs) in the context of human kappa light chain and IgG1 heavy chain sequences. DNA sequences encoding the humanized 3D6  $V_L$  and  $V_H$  sequences identified by this process (including the 5' signal peptide sequence and 3' intron splice-donor sequence) were generated by annealing synthesized overlapping DNA oligonucleotides followed by DNA polymerase fill-in reactions. The integrity of each of the humanized variable region sequences was verified by DNA sequencing. *Figure 1* depicts a schematic representation of the predicted structure of an exemplary humanized anti-A $\beta$  peptide 3D6 antibody termed h3D6v2. *Figure 2* identifies the complete amino acid sequences of the h3D6v2 light and heavy chains.

Humanized 3D6 antibody was expressed by transfection of a Chinese Hamster Ovary (CHO) host cell lineage with expression plasmids encoding anti-A $\beta$  antibody light chain and heavy chain genes. CHO cells expressing the antibody were isolated using standard methotrexate - based drug selection/gene amplification procedures. A clonal CHO cell line exhibiting the desired productivity and growth phenotypes was selected and used to establish an antibody expressing cell line using chemically defined medium free of animal or human-derived components.

## EXAMPLE 2

### PREPARATION OF A THERAPEUTIC POLYPEPTIDE USING A LARGE SCALE BIOREACTOR

In this example, the preparation of therapeutic polypeptide, in particular, an anti-A $\beta$  antibody, is described.

The polypeptide manufacturing process began with the thawing of a starter culture of clonal cells stably expressing the anti-A $\beta$  antibody. Cells were cultured using a chemically defined medium containing no animal or human-derived proteins. Cultures were then expanded and used to inoculate a seed bioreactor, which in turn was used to inoculate multiple production bioreactor cycles. The production bioreactor was operated in fed-batch mode. At the end of the production cycle, the conditioned medium harvest was clarified by microfiltration in preparation for further downstream processing.

The purification processes consisted of standard chromatographic steps followed by filtration. Purified antibody was concentrated by ultrafiltration and diafiltered into formulation buffer absent polysorbate-80. Optionally, polysorbate 80 (vegetable derived) is added to the ultrafiltration/diafiltration retentate pool, followed by bacterial retention filtration. The drug substance was stored frozen at -80°C and held for further manufacture into drug product, including stabilized liquid formulations described herein.

### **EXAMPLE 3**

#### **PREPARATION OF A STABILIZED LIQUID POLYPEPTIDE FORMULATION**

In this example, a typical composition of a stabilized liquid polypeptide formulation, is described.

Two batches of antibody drug product were manufactured. An initial batch was manufactured by compounding drug substance into an animal and human protein-free formulation containing 20 mg anti A $\beta$  antibody active substance per mL, 10 mM histidine, 10 mM methionine, 4% mannitol, 0.005% polysorbate-80, pH 6.0. The drug product was aseptically filled into vials, at 100 mg anti A $\beta$  antibody active substance/vial. The finished drug product vial contained no preservative and was intended for single-use only.

A second batch of drug product was manufactured by a similar method using a formulation buffer without polysorbate-80.

### **EXAMPLE 4**

#### **ANALYSIS OF STABILIZED LIQUID POLYPEPTIDE FORMULATIONS**

In this example, the analysis of various stabilized liquid polypeptide formulations, is described.

The stability and, in particular, the physicochemical integrity (such as aggregation and deamidation) of the formulation were assessed by the following methods well known in the art: appearance; pH; protein concentration (A280); ELISA, in part, as a test of bioactivity; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), in part as a test of aggregation; size exclusion high performance liquid chromatography (SEC-HPLC), in part, as a test of aggregation and stability in general; cation exchange high performance liquid chromatography (CEX-HPLC), in part, as a test of amination and stability in general; and peptide mapping.

These methods assessed the recovery and integrity of the protein under test conditions at various temperatures.

Appearance analysis of the formulations was conducted in order to determine the quality of the formulations at various time points. Analysis was conducted based on visual inspection for clarity, color and the presence of particulates. For example, the degree of opalescence was analyzed in terms of reference suspensions. Appearance analysis of the formulations made with and without polysorbate 80 in accordance with the present invention demonstrated that both formulations were acceptable when stored at each of -80°C, 5°C, 25°C, and 40°C at each of the following timepoints: initial, 1 month, 2 months, 3 months, 6 months, 9 months, and 12 months.

pH analysis sought to determine the maintenance of the formulation's pH within an acceptable range of about 5.5 to about 6.5. pH analysis of formulations made with and without polysorbate 80 in accordance with the present invention demonstrated that both formulations were acceptable when stored at each of -80°C, 5°C, 25°C, and 40°C at each of the following timepoints: initial, 1 month, 2 months, 3 months, 6 months, 9 months, and 12 months. Generally, the pH never ranged below 5.8 or above 6.2.

Protein concentration analysis by A280 assays was performed to determine the maintenance of the formulation's protein concentration within an acceptable range of about 17 mg/ml to about 23 mg/ml. Protein concentration analysis of formulations made with and without polysorbate 80 in accordance with the present invention demonstrated that both formulations were generally acceptable when stored at each of -80°C, 5°C, 25°C, and 40°C at each of the following timepoints: initial, 1 month, 2 months, 3 months, 6 months, 9 months, and 12 months. With the exception of the protein concentrations ranging slightly above 23 mg/ml for the formulation without polysorbate 80 when stored at 5°C, 25°C, and 40°C at the 3 month timepoints, the protein concentration otherwise remained within the acceptable ranges. Accordingly, the protein concentration analysis demonstrated no detectable loss of protein occurring, even at accelerated conditions, particularly for the formulations with polysorbate 80. Moreover, protein concentration generally failed to demonstrate a significant time or temperature dependent change subsequent to the initial time point.

Maintenance of biological activity was assayed, in part, by ELISA techniques. Biological activity was analyzed as BU/mg with acceptable activity being  $\geq 2500$  BU/mg or 50% (*i.e.*, 5000 BU/mg equates to 100%). ELISA analysis of formulations made with

and without polysorbate 80 in accordance with the present invention demonstrated that both formulations were generally acceptable when stored at each of -80°C, 5°C, 25°C, and 40°C at each of the following timepoints: initial, 1 month, 2 months, 3 months, 6 months, 9 months, and 12 months. With the exception of the biological activity ranging slightly below 50% at the 12 month time point for both formulations when stored at 40°C, the biological activity otherwise remained within the acceptable ranges.

SEC-HPLC analysis was conducted as a test of aggregation, purity and stability in general. SEC-HPLC runs under conditions using mobile phase chromatography with a sodium phosphate dibasic buffer indicated the formulation was acceptable if the SEC-HPLC analysis identified  $\geq 90\%$  IgG monomer, compared to percentage of high molecular weight product and low molecular weight product. SEC-HPLC analysis of formulations made with and without polysorbate 80 in accordance with the present invention demonstrated that both formulations were generally acceptable when stored at each of -80°C, 5°C, 25°C, and 40°C at each of the following timepoints: initial, 1 month, 2 months, 3 months, 6 months, 9 months, and 12 months. With the exception of the percentage monomer ranging below 90% for both formulations when stored at 40°C at each time point at and after 6 months (where the analysis identified greater than at least 10% low molecular weight product for both formulations at each time point), percentage monomer was otherwise within the acceptable range. SEC-HPLC analysis generally demonstrated that although the high molecular weight and low molecular weight profiles were different over time in samples with and without polysorbate, the monomeric form of the antibody generally remained constant, for example at the 12 month time point, when the formulation was stored at 5°C.

CEX-HPLC analysis was conducted as a test of amination and stability in general. CEX-HPLC runs under conditions using mobile phase chromatography with a NaCl buffer produced elution profile and retention times of predominant peaks which were analyzed as being comparable or not comparable to reference standard profiles. CEX-HPLC analysis of formulations made with and without polysorbate 80 in accordance with the present invention demonstrated that both formulations were generally acceptable when stored at each of -80°C, 5°C, 25°C, and 40°C at each of the following timepoints: initial, 1 month, 2 months, 3 months, 6 months, 9 months, and 12 months. With the exception of the elution profile and retention time of the predominant peaks not being comparable for both formulations when stored at 40°C at each time point

at and after 3 months, the predominant peaks were otherwise comparable to the reference peaks.

Generally, analysis of the formulations with polysorbate 80 stored at 5°C allow for the following particularly important conclusions: 1) opalescence, pH, ELISA, CEX-HPLC, SEC-HPLC and SDS PAGE analysis all showed minimal changes in the formulation over 9 months; 2) formulations stored at 5°C appeared more like reference samples over 9 months than the accelerated samples; 3) peptide mapping showed changes at 5°C; and 4) SEC-HPLC trending data at 5°C predicted at least 17.2 months of stability (see Figure 6), however, upon removing column, instrument and buffer variability, the data allowed for a prediction of greater than 30 months of stability (see Figure 7). Additionally, accelerated samples with polysorbate 80 stored at 25°C passed all specifications at 9 months (Figure 4).

Moreover, analysis of the formulations without polysorbate 80 stored at 5°C allow for the following particularly important conclusions: 1) opalescence, pH and ELISA analysis all showed minimal changes in the formulation over 9 months; 2) results of the CEX-HPLC and SDS PAGE showed comparable findings to reference samples or the -80°C control at 9 months; 3) SEC-HPLC analysis showed minor changes over 9 months while changes were more pronounced at accelerated temperatures; and 4) SEC-HPLC trending data predicted at least 18 months of stability, even with assay variability issues (see Figure 8).

Figures 3-5 are graphical depictions of the shelf life predictions for the formulations (with and without PS80) made in accordance with the present invention and stored at 5°C, 25°C, and 40°C, respectively. Generally, Figures 3-5 indicate that storage of the formulations of the present invention at higher temperatures reduces the expected shelf life. Figure 3, in particular, indicates that the formulation has an expected shelf life of at least 18 months when the formulation is stored at 5°C. Figure 4 indicates that storage of the formulation at room temperature (25°C) may serve to reduce expected shelf life to about 12 months. Figure 5 further demonstrates that storage of the formulation at 40°C may serve to reduce expected shelf life to about 4 months. Still further, Figure 9 indicates that at, for example, 5°C at 12 months, PS80 reduces the presence of high molecular weight by-products, for example, polypeptide aggregates.

#### EXAMPLE 5

### STABILITY STUDIES ON USE OF METHIONINE AS AN ANTI-OXIDANT

In this example, the analysis of various liquid polypeptide formulations stabilized with an antioxidant, in particular, methionine, is described.

Studies were conducted to determine the effect of methionine on maintaining the stability of an antibody in a therapeutic antibody formulation. SEC-HPLC analysis was conducted over 6 months at various temperatures on four antibody (an anti-CD22 IgG<sub>4</sub> antibody) samples: an antibody formulation with 20 mM succinate at a pH of 6.0; an antibody formulation with 20 mM succinate and 10 mM methionine; an antibody formulation with 20 mM succinate and 0.01% PS80; and an antibody formulation with 20 mM succinate, 10 mM methionine and 0.01% PS80. Generally, the results indicated that methionine desirably lessens high molecular weight (HMW) formation, for example, the formation of aggregates. Moreover, methionine decreases temperature dependent increase in the percent of HMW (see Figure 10).

Furthermore, a pH stability study (at pH 5.8, 6.0 and 6.2) was conducted over 6 weeks at various temperatures (5°C and 40°C) on the following four antibody (an anti-B7.2 IgG<sub>2</sub> antibody) samples: (1) a sample including antibody, 10 mM histidine and 150 mM NaCl; (2) a sample including antibody, 10 mM histidine, 150 mM NaCl and 0.01% PS80; (3) a sample including antibody, 10 mM histidine, 150 mM NaCl and 10 mM methionine; and (4) a sample including antibody, 10 mM histidine, 150 mM NaCl, 10 mM methionine and 0.01% PS80. SEC-HPLC analysis was conducted. The results demonstrated that methionine decreases the temperature dependent increase in percent of by-product formation (*e.g.*, HMW by-products) over the indicated pH range, (see Figure 11). As shown in Figure 11, samples containing methionine displayed a low amount of aggregation when maintained at 40°C for six weeks, which was similar to that for samples maintained at 5°C for six weeks.

### EXAMPLE 6

#### EXCIPIENT ANALYSIS OF STABILIZED LIQUID POLYPEPTIDE FORMULATIONS USING DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY

In this example, excipient analysis of various liquid polypeptide formulations using differential scanning calorimetry, is described.

A primary goal of protein drug formulation is to stabilize a protein in its native, biologically active form. Typically this can be done by screening various excipients in a

base formulation and monitoring their effect on the molecule's molecular weight and activity. These parameters are indicative of stability. Another measurement of stability is thermal denaturation which can be monitored using a variety of biophysical techniques. Generally, increased levels of protein stability have been attributed to high melting, denaturation or decomposition temperatures. Accordingly, thermal properties of an exemplary antigen-binding polypeptide, in particular, an IgG1 monoclonal antibody were monitored in the presence of various excipients using a VP-Capillary Differential Scanning Calorimeter. Specifically, the apparent  $T_m$ s were determined for formulations containing 10 mM histidine (pH 6.0) with various excipients. Several excipients were shown to provide increased or decreased thermal stability. Because increased levels of protein stability have been attributed to a high melting temperature, excipients in samples imparting an increased  $T_{m2}$  or  $T_{m3}$ , as compared to control  $T_{m2}$  /  $T_{m3}$  values (respectively, 74.9°C and 83.4°C), were deemed to be especially desirable excipients (see Table 1 below).

Accordingly, it was concluded that excipients such as glucose (formulated at a concentration of 4% and 10%), sucrose (formulated at a concentration of 4% and 10%), sorbitol (formulated at a concentration of 4% and 10%), and mannitol (formulated at a concentration of 4% and 10%), performed especially well in stabilizing a liquid polypeptide formulation, in particular, an antibody IgG formulation.

Table 1 Excipient Analysis Results

| Excipient           | Concentration | $T_{m1}^*$ | $T_{m2}^*$ | $T_{m3}^*$ |
|---------------------|---------------|------------|------------|------------|
| Histidine (Control) | 10 mM         | -          | 74.9       | 83.4       |
| NaCl                | 10 mM         | 69.3       | 74.8       | 82.9       |
|                     | 100 mM        | 67.9       | 74.4       | 82.4       |
|                     | 500 mM        | 66.5       | 74.5       | 81.9       |
|                     | 1 M           | 65.4       | 74.9       | 82.3       |
| CaCl <sub>2</sub>   | 10 mM         | 68.7       | 74.6       | 82.7       |
|                     | 100 mM        | 68.5       | 74.5       | 82.4       |
| Methionine          | 30 mM         | -          | 74.5       | 83.7       |
| Vitamin C           | ~30 mM        | 52.2       | 68.7       | -          |
| Polysorbate 20      | 0.005%        | -          | 74.5       | 83.7       |
|                     | 0.01%         | -          | 74.5       | 83.8       |

|                |        |   |      |      |
|----------------|--------|---|------|------|
|                | 0.1%   | - | 74.4 | 83.7 |
| Polysorbate 80 | 0.005% | - | 74.6 | 83.8 |
|                | 0.01%  | - | 74.5 | 83.7 |
|                | 0.1%   | - | 74.5 | 83.7 |
| Glucose        | 0.5%   | - | 74.7 | 83.8 |
|                | 2%     | - | 74.9 | 83.9 |
|                | 4%     | - | 75.0 | 84.3 |
|                | 10%    | - | 75.8 | 84.9 |
| Sucrose        | 0.5%   | - | 74.6 | 83.6 |
|                | 2%     | - | 74.8 | 83.8 |
|                | 4%     | - | 75.0 | 83.9 |
|                | 10%    | - | 75.5 | 84.4 |
| Sorbitol       | 0.5%   | - | 74.8 | 83.6 |
|                | 2%     | - | 75.0 | 83.8 |
|                | 4%     | - | 75.2 | 84.1 |
|                | 10%    | - | 75.9 | 84.8 |
| Mannitol       | 0.5%   | - | 74.8 | 83.6 |
|                | 2%     | - | 74.9 | 83.8 |
|                | 4%     | - | 75.2 | 84.1 |
|                | 10%    | - | 75.9 | 84.8 |

\*In the control (10 mM histidine, pH 6.0) two transitions were observed, T<sub>m</sub>2 and T<sub>m</sub>3. An earlier transition (T<sub>m</sub>1) was seen in the presence of some excipients.

*Equivalents*

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

We Claim:

1. A liquid formulation comprising,  
a therapeutically active antigen-binding polypeptide, wherein the polypeptide exhibits by-product formation during storage, and  
an antioxidant, wherein said antioxidant is present in an amount sufficient to reduce the by-product formation of the polypeptide during storage of the formulation.
2. The formulation of claim 1, wherein the therapeutically active antigen-binding polypeptide component is selected from the group consisting of an antibody, an antibody Fv fragment, an antibody Fab fragment, an antibody Fab'(2) fragment, an antibody Fd fragment, a single-chain antibody (scFv), a single domain antibody fragment (Dab), a beta-pleated sheet polypeptide comprising at least one antibody complementarity determining region (CDR), and a non-globular polypeptide comprising at least one antibody complementarity determining region.
3. The formulation of claim 1, wherein the therapeutically active antigen-binding polypeptide is an antibody.
4. The formulation of claim 3, wherein the antibody is of a subtype selected from the group consisting of IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4.
5. The formulation of claim 3, wherein the by-product is selected from the group consisting of a high molecular weight polypeptide aggregate, a low molecular weight polypeptide degradation product, and combinations thereof.
6. The formulation of claim 5, wherein the high molecular weight aggregate is selected from the group consisting of antibody:antibody complexes, antibody:antibody fragment complexes, antibody fragment:antibody fragment complexes, and combinations thereof.
7. The formulation of claim 5, wherein the low molecular weight polypeptide degradation product is selected from the group consisting of an antibody

light chain, an antibody heavy chain, an antibody light chain and heavy chain complex, an antibody fragment, and combinations thereof.

8. The formulation of claim 1, wherein the antioxidant is selected from the group consisting of methionine and an analog thereof.

9. The formulation of claim 8, wherein the methionine is present in an amount of about 0.1 mM to about 25 mM.

10. The formulation of claim 8, wherein the methionine is present in an amount of about 10 mM.

11. The formulation of claim 1, wherein the formulation is suitable for administering parenterally, intravenously, intramuscularly, subcutaneously, intracranially, or epidurally.

12. The formulation of claim 1, wherein the formulation is capable of traversing the blood-brain-barrier.

13. The formulation of claim 1, wherein the formulation further comprises a tonicity agent.

14. The formulation of claim 13, wherein the tonicity agent is mannitol.

15. The formulation of claim 13, wherein the formulation is suitable for intravenous administration.

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

17. A liquid formulation comprising an antigen-binding polypeptide, methionine, histidine, and mannitol.

18. The formulation of claim 17, wherein the formulation is suitable for intravenous administration.
19. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the antigen-binding polypeptide binds to an antigen of an antigen class selected from the group consisting of cancer antigens, autoimmune antigens, allergens, and pathogens.
20. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the antigen-binding polypeptide is present from about 0.1 mg/ml to about 200 mg/ml.
21. The formulation of any one of the preceding claims, wherein antigen-binding polypeptide is present at about 17 mg/ml.
22. The formulation of any one of claims 1-20, wherein antigen-binding polypeptide is present at about 20 mg/ml.
23. The formulation of any one of claims 1-20, wherein antigen-binding polypeptide is present at about 30 mg/ml.
24. The formulation of any one of claims 14 and 17-23, wherein mannitol is present in amount sufficient to maintain isotonicity of the formulation.
25. The formulation of any one of claims 14 and 17-24, wherein mannitol is present from about 2% w/v to about 10% w/v.
26. The formulation of any one of claims 14 and 17-24, wherein mannitol is present at about 4% w/v.
27. The formulation of any one of claims 14 and 17-24, wherein mannitol is present at about 6% w/v.
28. The formulation of any one of claims 14 and 17-24, wherein mannitol is present at about 10% w/v.

29. The formulation of any one of claims 16-28, wherein histidine is present in an amount sufficient to maintain a physiologically suitable pH.

30. The formulation of any one of claims 16-29, wherein histidine is present from about 0.1 mM to about 25 mM.

31. The formulation of any one of claims 16-29, wherein histidine is present at about 10 mM.

32. The formulation of any one of the preceding claims, further comprising a stabilizer.

33. The formulation of claim 32, wherein the stabilizer comprises polysorbate 80.

34. The formulation of claim 33, wherein the polysorbate 80 is present from about 0.001% w/v to about 0.01% w/v.

35. The formulation of claim 33, wherein the polysorbate 80 is present at about 0.005% w/v.

36. The formulation of claim 33, wherein the polysorbate 80 is present at about 0.01% w/v.

37. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the formulation has a pH of about 4 to about 9.

38. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the formulation has a pH of about 6 to about 7.

39. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable to freezing.

40. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable for at least about 12 months.

41. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable for at least about 18 months.

42. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable for at least about 24 months.

43. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable for at least about 30 months.

44. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable at about -80°C to about 40°C.

45. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable at about 0°C to about 25°C.

46. The formulation of any one of the preceding claims, wherein the formulation is stable at about 2°C to about 8°C.

47. A pharmaceutical unit dosage form comprising an effective amount of the formulation of any of the preceding claims for treating disease in a patient via administration of said dosage form to said patient.

48. The pharmaceutical unit dosage form of claim 47 which is a container containing said formulation.

49. The container of claim 47, which is a vial containing about 1 mg to about 2000 mg of said A $\beta$  binding polypeptide.

50. The container of claim 47, which is a vial containing about 50 mg to about 1500 mg of said A $\beta$  binding polypeptide.

51. The container of claim 47, which is a vial containing about 5 mg to about 50 mg of said A $\beta$  binding polypeptide.

52. The pharmaceutical unit dosage form of claim 47, wherein said vial has a volume of about 2 to about 100 ml.

53. The pharmaceutical unit dosage form of claim 47, wherein said vial has a volume of about 2 to about 10 ml.

54. The pharmaceutical unit dosage form any of claims 47-53, suitable for intravenous infusion to said patient.

55. A kit comprising,  
a) the pharmaceutical unit dosage form of any one of claims 47-54; and  
b) instructions for use.

56. A container comprising the pharmaceutical unit dosage form of claim 47 which is a container labeled for use.

57. The container of claim 56 labeled for prophylactic use.

58. The container of claim 56 labeled for therapeutic use.

59. A method for increasing the stability of an antigen-binding polypeptide in a liquid pharmaceutical formulation, where the polypeptide exhibits by-product formation during storage in a liquid formulation, the method comprising incorporating into the formulation an anti-oxidant in an amount sufficient to reduce the amount of by-product formation of the polypeptide.

60. The method of claim 59, wherein the antigen-binding polypeptide component is selected from the group consisting of an antibody, an antibody Fv fragment, an antibody Fab fragment, an antibody Fab'(2) fragment, an antibody Fd fragment, a single-chain antibody (scFv), a single domain antibody fragment (Dab), a beta-pleated sheet polypeptide comprising at least one antibody complementarity determining region (CDR), and a non-globular polypeptide comprising at least one antibody complementarity determining region.

61. The method of claim 59, wherein the by-product is selected from the group consisting of a high molecular weight polypeptide aggregate, a low molecular weight polypeptide degradation product, and combinations thereof.

62. The method of claim 59, wherein the antioxidant is selected from the group consisting of methionine and an analog thereof.

63. A method for preparing the formulation of any of claims 1-46, comprising combining the excipients of the formulation.

64. A method for preparing the formulation of any of claims 1-46, comprising combining the antigen binding polypeptide with one or more diluents, wherein said one or more diluents comprise the excipients of the formulation.

65. A method for preparing a pharmaceutical unit dosage form comprising combining the formulation of any of claims 1-46 in a suitable container.

66. A method for preparing the formulation of any one of claims 1-46 comprising combining a solution comprising the antigen binding polypeptide and a least a portion of the excipients with a diluent comprising the remainder of the excipients.

67. A formulation stable for at least about 12 months at a temperature of above freezing to about 10°C and having a pH of about 5.5 to about 6.5, comprising:

- i. at least antigen-binding polypeptide at a concentration of about 1 mg/ml to about 30 mg/ml;

- ii. mannitol at a concentration of about 4% w/v or NaCl at a concentration of about 150 mM;
- iii. about 5 mM to about 10 mM histidine or succinate; and
- iv. 10 mM methionine.

68. The formulation of claim 67, wherein the formulation is stable for at least about 24 months at a temperature of about 2°C to 8°C, and comprises polysorbate 80 at a concentration of about 0.001% w/v to about 0.01% w/v.

69. The formulation of claim 67, wherein the formulation has a pH of about 6.0 to about 6.5 and comprises about 10 mg/ml antigen-binding polypeptide, about 10 mM histidine and about 4% w/v mannitol and about .005% w/v polysorbate 80.

70. The formulation of claim 67, wherein the formulation has a pH of about 6.0 to about 6.2 and comprises about 20 mg/ml antigen-binding polypeptide, about 10 mM histidine, about 4% w/v mannitol and about .005% w/v polysorbate 80.

71. The formulation of claim 67, wherein the formulation has a pH of about 6.0 to about 6.2 and comprises about 30 mg/ml antigen-binding polypeptide, about 10 mM histidine, about 4% w/v mannitol and about .005% w/v polysorbate 80.

72. The formulation of claim 71, further comprising about 4% w/v mannitol.

73. The formulation of claim 71, further comprising polysorbate 80 at a concentration of about 0.001% w/v to about 0.01% w/v.

74. The formulation of claim 73, comprising about 0.005% w/v polysorbate 80.

75. The formulation of claim 71, wherein the antigen-binding polypeptide is present at a concentration of about 17 mg/ml to about 23 mg/ml.

76. A formulation stable for at least about 24 months at a temperature of about 2°C to about 8°C and having a pH of about 5.5 to about 6.5, comprising about 2 mg/ml to about 23 mg/ml of a antigen-binding polypeptide, about 10 mM succinate, about 10 mM methionine, about 4% w/v mannitol and about 0.005% w/v polysorbate 80.

77. A formulation stable when thawed from about -50°C to about -80°C, comprising about 40 to about 60 mg/ml of antigen-binding polypeptide, about 1.0 mg/ml to about 2.0 mg/ml histidine, about 1.0mg/ml to 2.0 mg/ml methionine and about 0.05 mg/ml polysorbate 80, wherein the formulation has a pH of about 6.0.

78. The formulation of claim 77, wherein mannitol is excluded.

79. A formulation comprising about 20 mg/mL antigen-binding polypeptide, about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 4% mannitol and having a pH of about 6.

80. A formulation comprising about 30 mg/mL antigen-binding polypeptide, about 10 mM succinate, about 10 mM methionine, about 6% mannitol and having a pH of about 6.2.

81. A formulation comprising about 20 mg/mL antigen-binding polypeptide, about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 4% mannitol, about 0.005% polysorbate 80, and having a pH of about 6.

82. A formulation comprising about 10 mg/mL antigen-binding polypeptide, about 10 mM succinate, about 10 mM methionine, about 10% mannitol, about 0.005% polysorbate 80, and having a pH of about 6.5.

83. A formulation comprising about 5 mg/mL to about 20 mg/mL antigen-binding polypeptide, about 5 mM to about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 4% mannitol, about 0.005% polysorbate 80, and having a pH of about 6.0 to about 6.5.

84. A formulation comprising about 5 mg/mL to about 20 mg/mL antigen-binding polypeptide, about 5 mM to about 10 mM L-histidine, about 10 mM methionine, about 150 mM NaCl, about 0.005% polysorbate 80, and having a pH of about 6.0 to about 6.5.

85. A pharmaceutical unit dosage form, comprising a formulation comprising:

- a. about 10 mg to about 250 mg of an antigen-binding polypeptide;
- b. about 4% mannitol or about 150 mM NaCl;
- c. about 5 mM to about 10 mM histidine or succinate; and
- d. about 10 mM methionine

86. The pharmaceutical unit dosage form of claim 85, comprising about 0.001% to about 0.1% polysorbate 80.

87. The pharmaceutical unit dosage form of claim 86, comprising about 40 mg to about 60 mg of the antigen-binding polypeptide.

88. The pharmaceutical unit dosage form of claim 86, comprising about 60 mg to about 80 mg of the antigen-binding polypeptide.

89. The pharmaceutical unit dosage form of claim 86, comprising about 80 mg to about 120 mg of the antigen-binding polypeptide.

90. The pharmaceutical unit dosage form of claim 86, comprising about 120 mg to about 160 mg of the antigen-binding polypeptide.

91. The pharmaceutical unit dosage form of claim 86, comprising about 160 mg to about 240 mg of the antigen-binding polypeptide.

92. A therapeutic product, comprising:

- a. a glass vial, comprising a formulation comprising:

- i. about 10 mg to about 250 mg of a antigen-binding polypeptide,
  - ii. about 4% mannitol or about 150 mM NaCl,
  - iii. about 5 mM to about 10 mM histidine, and
  - iv. about 10 mM methionine; and
- b. labeling for use comprising instructions to use the appropriate volume necessary to achieve a dose of about 0.15 mg/kg to about 5 mg/kg.

93. The therapeutic product of claim 92, wherein the dose is about .5 mg/kg to about 3 mg/kg.

94. The therapeutic product of claim 92, wherein the dose is about 1 mg/kg to about 2 mg/kg.

95. The therapeutic product of claim 92, wherein the antigen-binding polypeptide concentration is about 10 mg/ml to about 60 mg/ml.

96. The therapeutic product of claim 92, wherein the antigen-binding polypeptide concentration is about 20 mg/ml.

97. The therapeutic product of claim 92, further comprising about 0.005% polysorbate 80.

98. The therapeutic product of claim 92, wherein the use is a subcutaneous administration.

99. The therapeutic product of claim 92, wherein the use is an intravenous administration.

FIG. 1

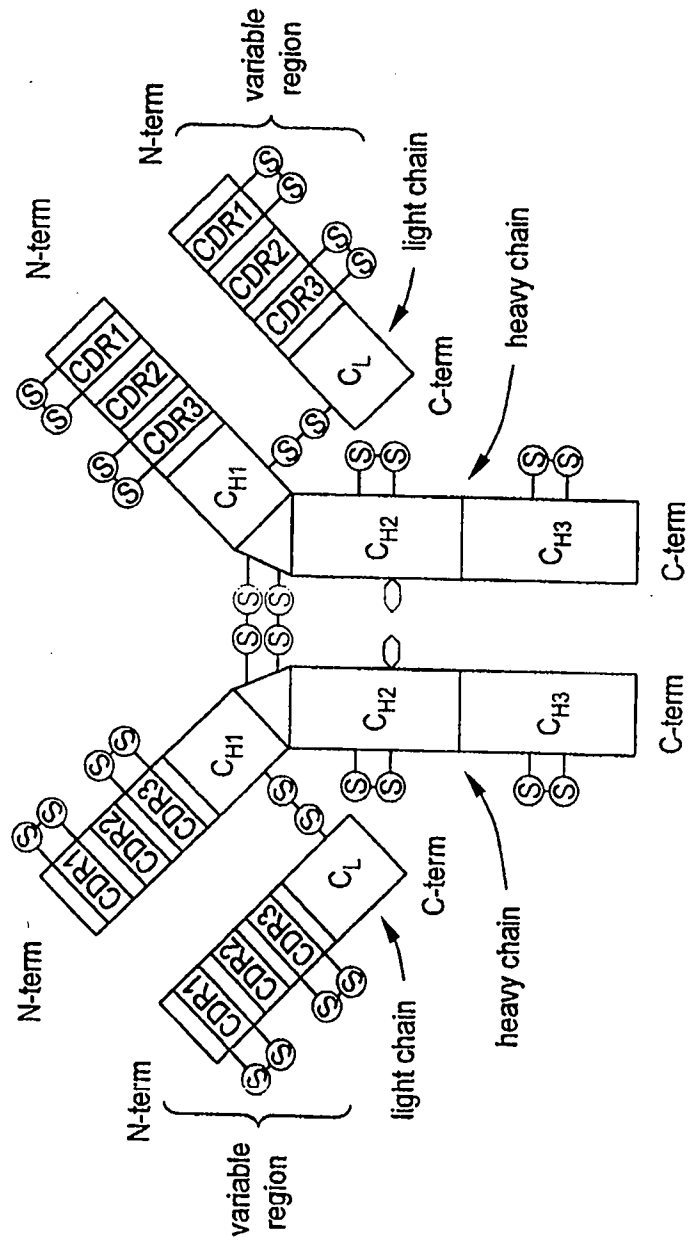


FIG. 2

Light Chain

1 DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCKSSQSIL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ  
51 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDETLFI SRVEAEDVG VYCWQGTTHFP  
101 RTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
151 VQWKVDNALQ SGENQESVTE QDSKDSITYEL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE  
201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

Heavy Chain

Heavy Chain

1 EVQLLESGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYGMSWVRQA PGKGLEWVAS  
51 IRSGGGRTYY SDNVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCVRYD  
101 HYGSSDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFFL APSSKSTSGG TAAIGCLVKD  
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSEG LYSLSSTVTV PSSSLGTQTY  
201 ICNVNHHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCIP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK

Light Chain Heavy Chain

251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKENAY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
301 TYRVSVLT V LHDWLNGKE YCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
351 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL  
401 DSDGSFFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG (K)

3/11

FIG. 3A

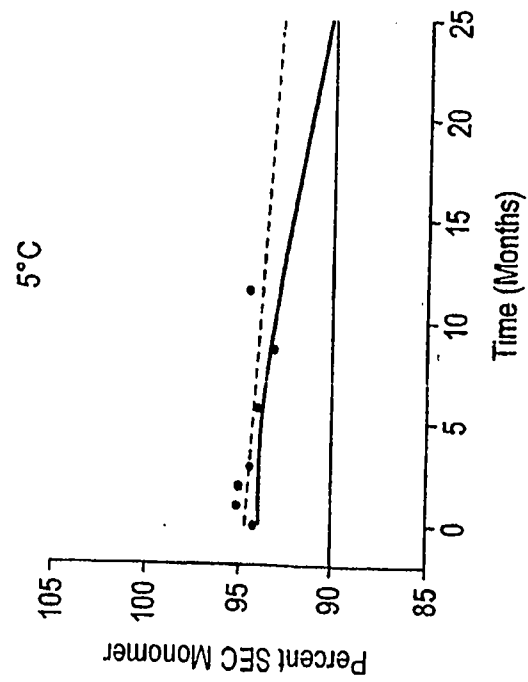
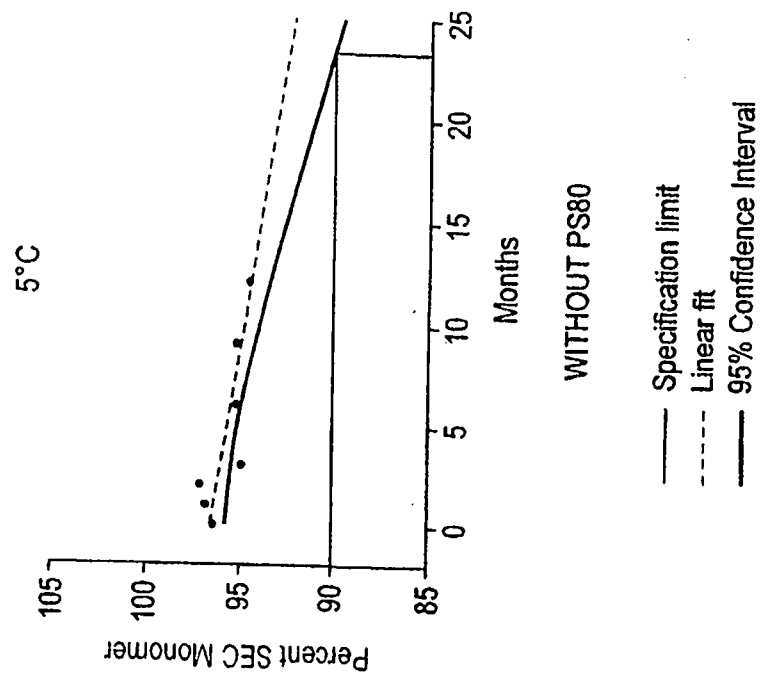


FIG. 3B



4/11

FIG. 4A

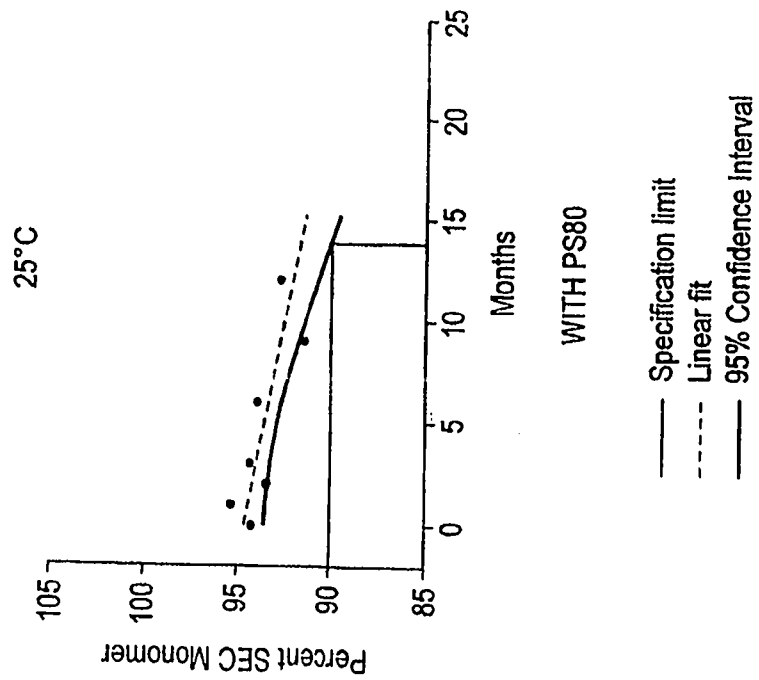
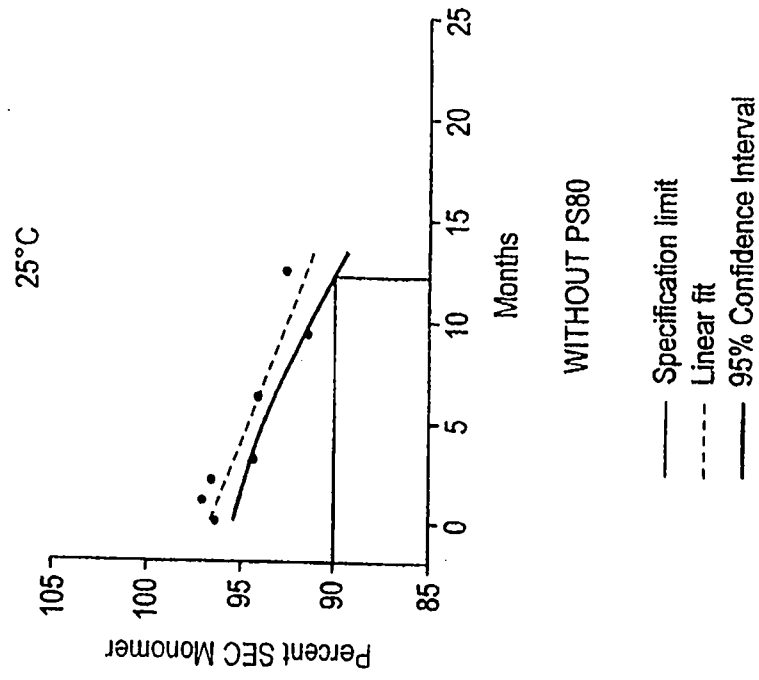


FIG. 4B



5/11

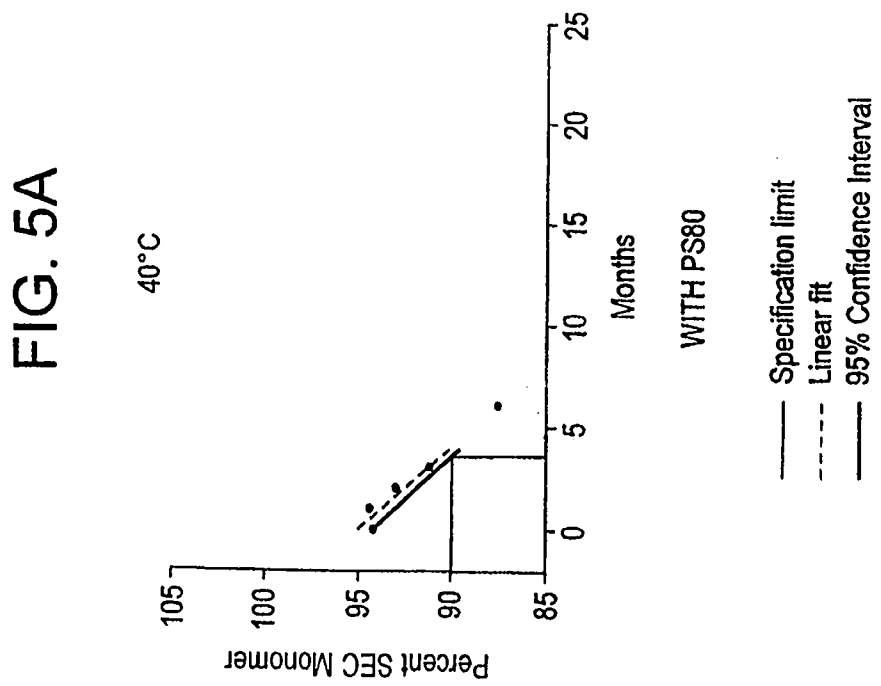
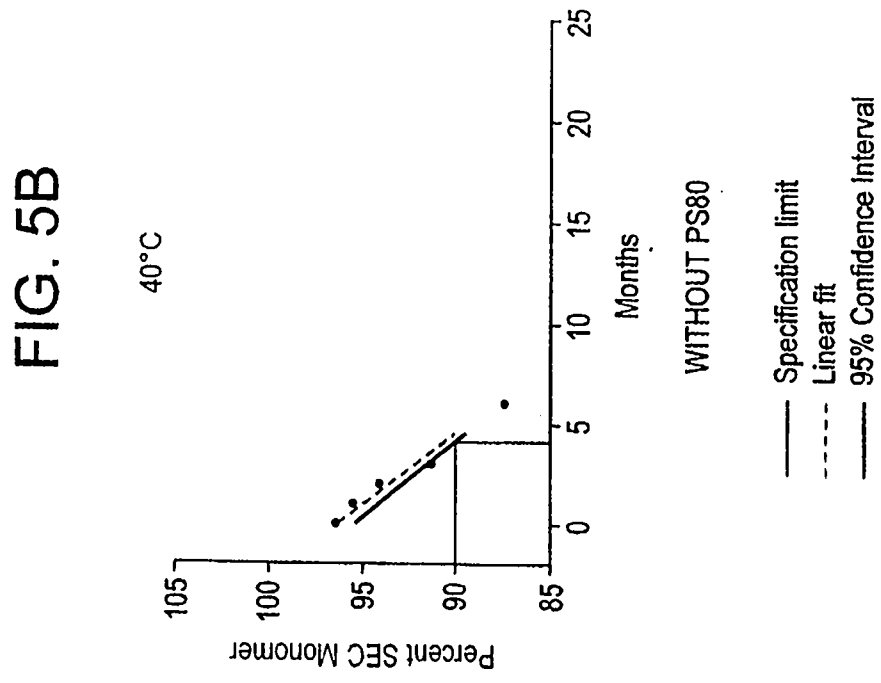


FIG. 6

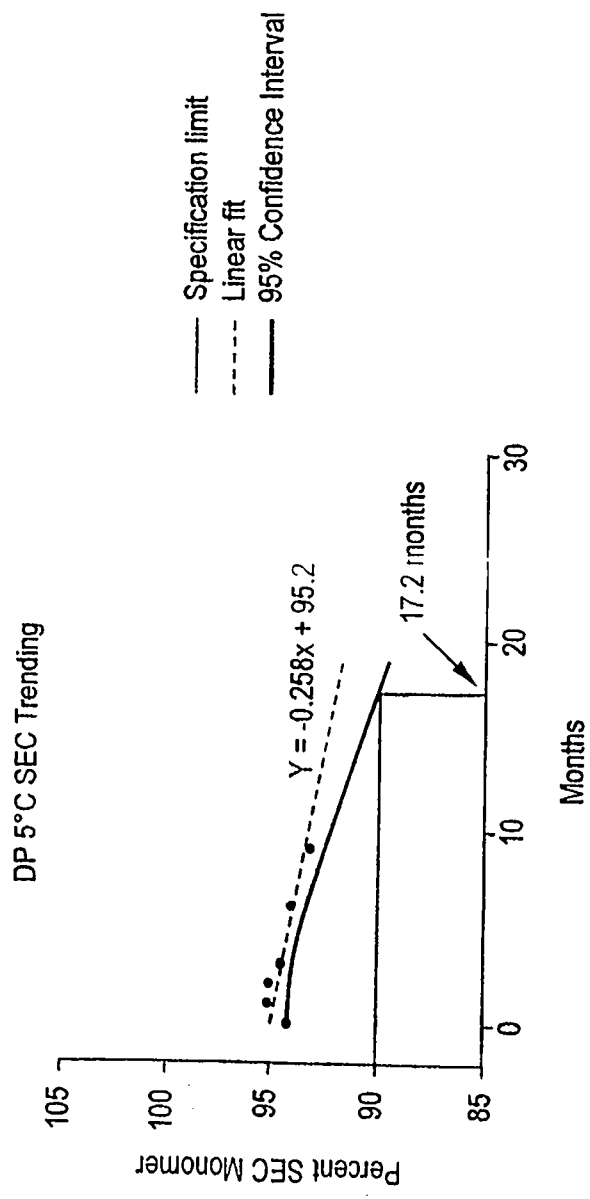


FIG. 7A

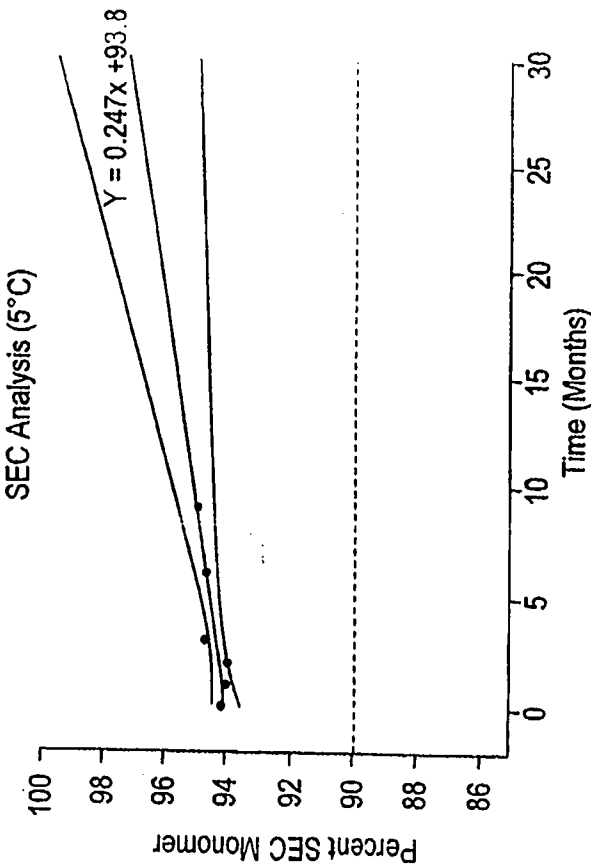


FIG. 7B

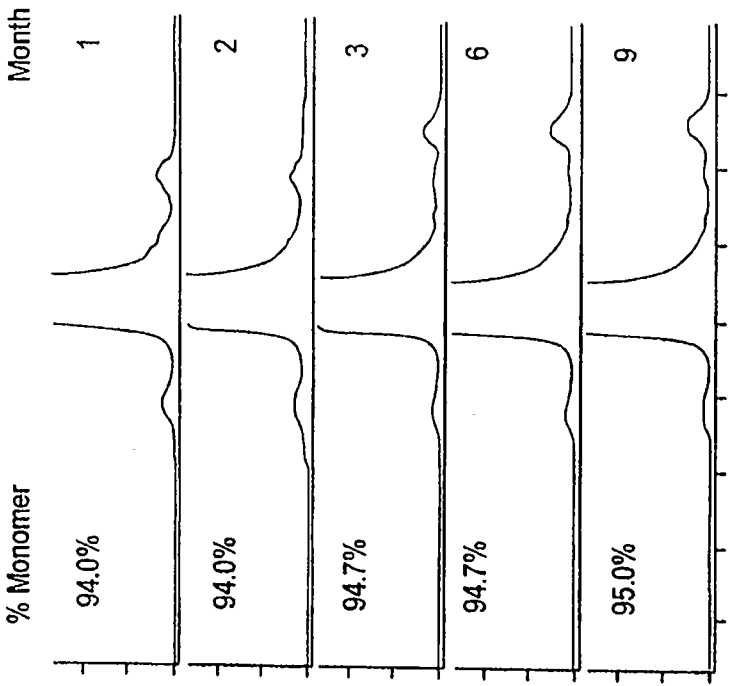
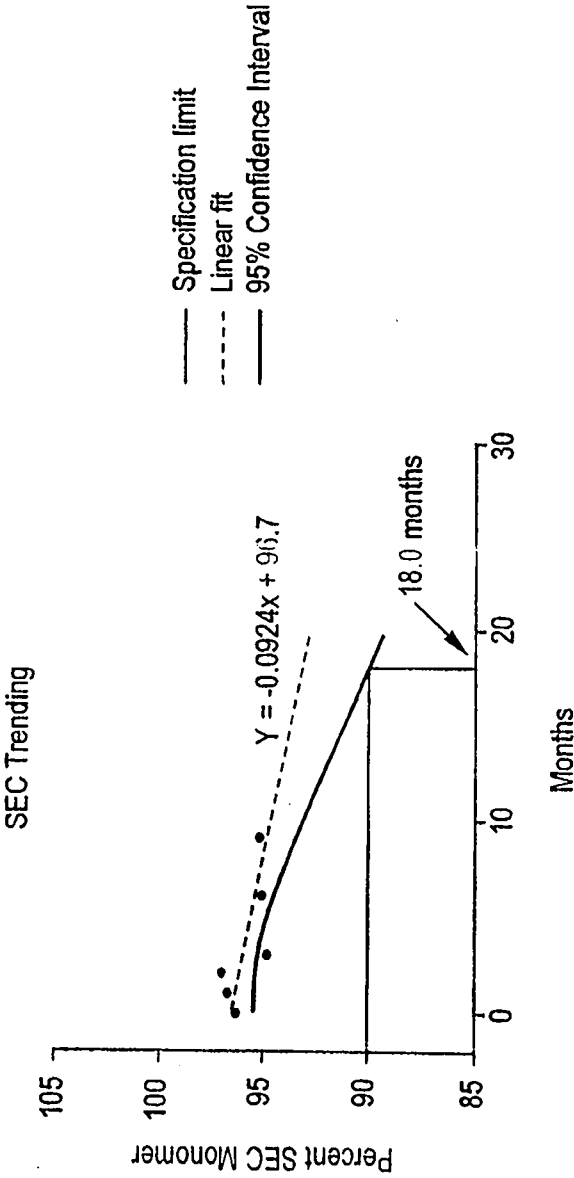
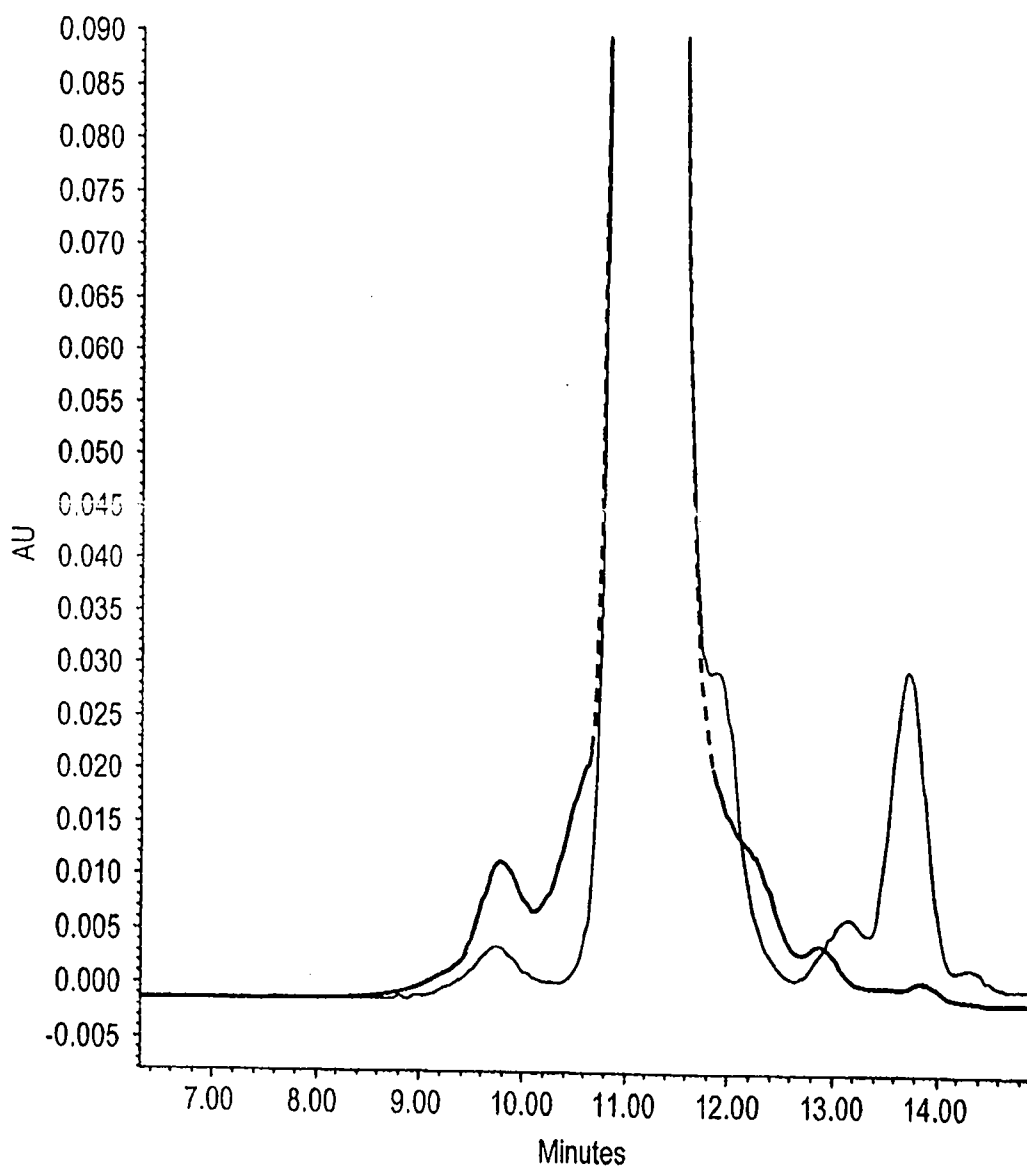


FIG. 8



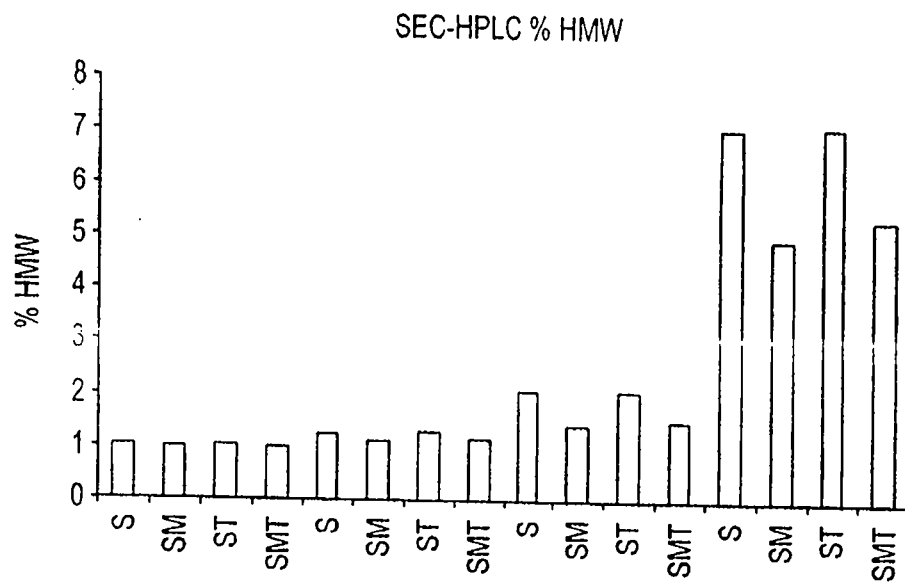
9/11

FIG. 9



10/11

FIG. 10



S: 20 mM succinate pH 6.0  
SM: succinate + 10 mM methionine  
ST: succinate + 0.01% PS80  
SMT: succinate + met + PS80  
Concentration 14 mg/mL

11/11

FIG. 11A

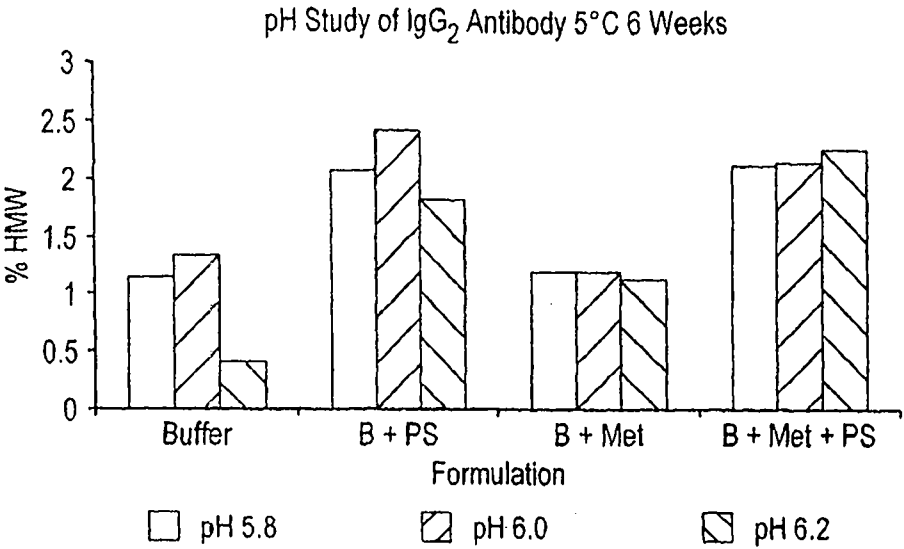
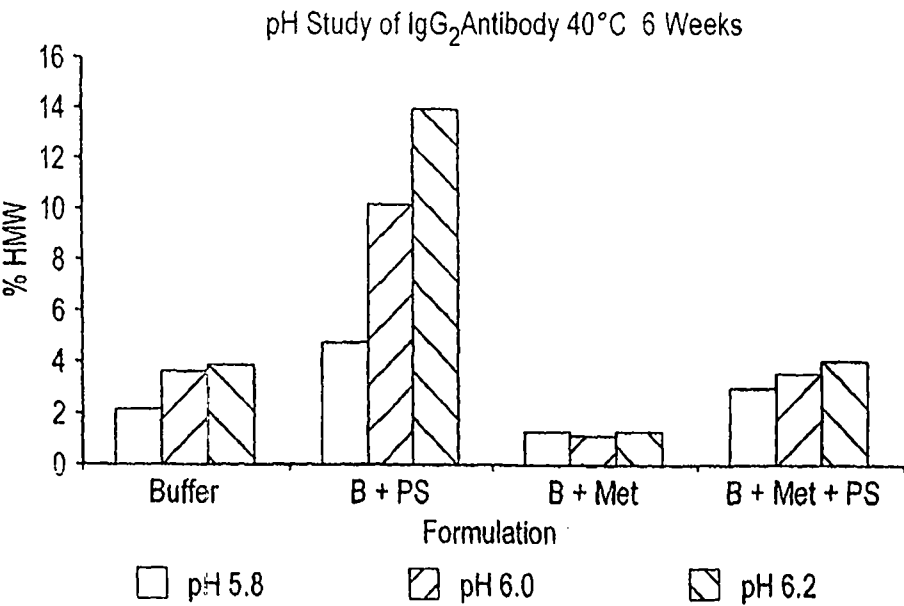


FIG. 11B



Buffer: 10 mM histidine, 150 mM NaCl  
B+PS: 10 mM histidine, 150 mM NaCl, 0.01% PS80  
B+Met: 10 mM histidine, 150 mM NaCl, 10 mM methionine  
B+Met+PS: 10 mM histidine, 150 mM NaCl, 10 mM methionine, 0.01% PS80  
Concentration 1 mg/mL

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Wyeth et al.

&lt;120&gt; STABILIZED LIQUID POLYPEPTIDE FORMULATIONS

&lt;130&gt; AHN-072PC

&lt;150&gt; 60/648639

&lt;151&gt; 2005-01-28

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 219

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

&lt;400&gt; 1

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1      5      10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20     25     30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35     40     45
Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50     55     60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65     70     75     80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85     90     95
Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100    105    110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115    120    125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130    135    140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145    150    155    160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165    170    175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180    185    190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195    200    205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210    215

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 448

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Construct

```

<400> 2
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20      25      30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35      40      45
Ala Ser Ile Arg Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ser Asp Asn Val
50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85      90      95
Val Arg Tyr Asp His Tyr Ser Gly Ser Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115      120      125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130      135      140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145      150      155      160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165      170      175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180      185      190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195      200      205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210      215      220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225      230      235      240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245      250      255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260      265      270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275      280      285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290      295      300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305      310      315      320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325      330      335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340      345      350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355      360      365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370      375      380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385      390      395      400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405      410      415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420      425      430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435      440      445

```

## **FORMULACIONES DE POLIPÉPTIDO LÍQUIDAS ESTABILIZADAS**

### **INFORMACIÓN RELACIONADA**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional US que lleva el número de Serie 60/648,639 (presentada en Enero 28, 2005), titulada "Stabilized Liquid Polypeptide Formulations". El contenido completo de la solicitud referenciada anteriormente se incorpora aquí como referencia.

El contenido de todas las otras patentes, solicitudes de patentes, y referencias citadas a través de esta especificación también se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Para maximizar el beneficio farmacológico de cualquier polipéptido, es esencial tener formas de dosis terminadas que sean estables, elaboradas en forma fácil y reproducible, y diseñadas para rutas estándar de administración. Específicamente, es deseable tener formas estables, concentradas de proteína en masa, por ejemplo, polipéptidos terapéuticos los cuales, a su vez, son adecuados para la elaboración adicional en formas de dosis terminadas del polipéptido, que puedan ser entonces administradas por *vía* de una ruta de administración deseada.

Tanto en las formas de dosis de polipéptido en masa como terminada, la estabilidad del polipéptido se puede afectar por factores tales como la concentración

iónica, el pH, la temperatura, los sitios repetidos de congelamiento/déscongelamiento y las fuerzas de corte. El polipéptido activo se puede perder como resultado de inestabilidades físicas, que incluyen desnaturalización y agregación (tanto de la formación del agregado soluble como insoluble), así como también las inestabilidades químicas, que incluyen, por ejemplo, hidrólisis, desamidación, y oxidación, para nombrar sólo unas pocas. Para una revisión general de la estabilidad de los farmacéuticos de proteína, ver, por ejemplo, Manning, et al., *Pharmaceutical Research* 6:903-918 (1989). Además, es deseable mantener la estabilidad cuando los polipéptidos vehículo no están incluidos en la formulación.

Aunque se aprecia ampliamente que estas inestabilidades posibles del polipéptido pueden ocurrir, hasta que se halla estudiado un polipéptido es imposible predecir los problemas de estabilidad particulares que pueda tener una proteína particular. Cualquiera de estas inestabilidades puede resultar potencialmente en la formación de un subproducto de polipéptido o derivado que tenga una actividad disminuida, una toxicidad creciente, y/o una inmunogenicidad creciente. De hecho, la precipitación del polipéptido puede conducir a trombosis, no homogeneidad de la forma de dosis y reacciones inmunes. Así, la seguridad y la eficacia de cualquier formulación farmacéutica de un polipéptido están directamente relacionadas con su estabilidad.

De acuerdo con esto, subsiste la necesidad en la técnica métodos para mejorar la estabilidad de la proteína durante el proceso de concentración así como también suministrar estabilidad en ausencia de otras proteínas portadoras en una concentración suficientemente alta para varias rutas de administración.

## **RESUMEN DE LA INVENCION**

La presente invención suministra formulaciones diseñadas para suministrar estabilidad y mantener la actividad biológica de una proteína biológicamente activa incorporada, en particular un polipéptido unido a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de éste. La invención suministra además formulaciones de polipéptido, es decir, formulaciones de polipéptido líquido estabilizadas que sean resistentes a la formación de subproductos de polipéptidos indeseables.

La integridad de los polipéptidos unidos a antígeno para uso terapéutico es especialmente importante porque si el polipéptido forma subproductos, por ejemplo, agregados o fragmentos de degradación durante el almacenamiento, por lo cual se puede perder la bioactividad, comprometiendo la actividad terapéutica de la molécula por dosis unitaria. Además, existe la fuerte necesidad de estabilizar polipéptidos terapéuticos destinados a funciones especializadas para suministro y uso de ciertas indicaciones biológicas, por ejemplo, tratamiento de condiciones neurodegenerativas, donde un polipéptido debe atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) y unirse a un antígeno blanco.

Anticuerpo de ejemplo que deben ser estabilizados para tal uso incluyen aquellos anticuerpos adecuados para unir blancos de enfermedad, en particular, blancos de enfermedad antigénica, por ejemplo, antígenos de cáncer, antígenos autoinmunes, alérgenos, y patógenos.

De acuerdo con esto, la invención tiene varias ventajas que incluyen, pero no están limitadas a, las siguientes:

-formulaciones de polipéptido líquido estabilizadas que se estabilizan contra la formación de subproductos de polipéptido mediante la adición de un antioxidante;

-formulaciones de polipéptido líquidas estabilizadas adecuadas para uso en una variedad de rutas de administración;

-métodos para preparar polipéptidos terapéuticos para el uso farmacéutico como formulaciones de polipéptido líquidas estabilizadas; y

-formulaciones de polipéptido de unión A $\beta$  estabilizadas adecuadas para uso en el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa.

De acuerdo, con un aspecto, la invención suministra una formulación de polipéptido líquida estabilizada designada para suministrar estabilidad y mantener la actividad biológica del polipéptido incorporado. En aún otro aspecto, la presente invención suministra una formulación que contiene un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo, y un antioxidante, por ejemplo, metionina o un análogo de estos, en donde el antioxidante está en una cantidad suficiente para reducir la formación de subproducto del polipéptido durante el almacenamiento de la formulación.

En una modalidad, el componente de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo de la formulación es un anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>), (por ejemplo, el anticuerpo de isotipo IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> humano) un fragmento de anticuerpo Fv, un fragmento de anticuerpo Fab, un

fragmento anticuerpo Fab'(2), un fragmento de anticuerpo Fd, un anticuerpo de cadena simple (scFv), un fragmento de anticuerpo de dominio simple (Dab), un polipéptido de lámina plegada beta que comprende al menos una región determinante de complementariedad de anticuerpo (CDR), o un polipéptido no globular que comprende al menos una región determinante de complementariedad de anticuerpo (CDR).

En una modalidad particular, las formulaciones de polipéptido líquido se estabilizan contra la formación de subproductos indeseables tales como agregados de polipéptido de alto peso molecular, productos de degradación de polipéptido de bajo peso molecular, o mezclas de estos.

En una modalidad relacionada, en donde el polipéptido de unión de antígeno terapéutico es un anticuerpo, los agregados de alto peso molecular típicos son, por ejemplo, complejos anticuerpo: anticuerpo, complejos anticuerpo: fragmento de anticuerpo, complejos fragmento de anticuerpo: fragmento de anticuerpo, o mezclas de estos. En general, los complejos de alto peso molecular o los subproductos tienen un peso molecular mayor de un monómero del polipéptido de unión de antígeno, por ejemplo, en el caso de un anticuerpo IgG, mayor de aproximadamente 150 kD.

En una modalidad relacionada, cuyo el polipéptido terapéutico es un anticuerpo, los productos de degradación del polipéptido de peso molecular bajo típicos son, por ejemplo, complejos que consisten de una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, una cadena ligera de anticuerpo y un complejo de cadena pesado, o mezclas de estos. En general, los complejos de bajo peso molecular o los subproductos tienen un peso molecular menor del de un monómero del polipéptido de unión de antígeno, por ejemplo, en el caso de un anticuerpo IgG, menos de aproximadamente 150 kD.

En un aspecto, la invención suministra una formulación estabilizada de un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de éste), metionina, donde la metionina está presente como un antioxidante en una cantidad suficiente para disminuir la formación de subproductos indeseables, un agente de tonicidad (por ejemplo, manitol), donde el agente de tonicidad está presente en una cantidad suficiente para hacer la formulación adecuada para administración, por ejemplo, infusión intravenosa, y un aminoácido (por ejemplo, histidina) o derivado de éste, donde el aminoácido o derivado de éste está presente en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado.

En un aspecto, la invención suministra una formulación estabilizada de un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión de anticuerpo) de éste, metionina, donde la metionina está presente como un antioxidante en una cantidad suficiente para inhibir la formación de subproductos indeseables, un agente de tonicidad, (por ejemplo, manitol) donde el agente de tonicidad está presente en un cantidad suficiente para hace la formulación adecuada para infusión intravenosa, y un aminoácido (por ejemplo histidina) o derivado de éste, donde el aminoácido o derivado de éste está presente en una cantidad suficiente para mantener el pH fisiológicamente adecuado.

En otro aspecto, la presente invención suministra una formulación que incluye un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de éste), manitol e histidina. En otro aspecto, la invención suministra una formulación estabilizada que incluye u polipéptido de un unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de éste), metionina, manitol e histidina.

En ciertas modalidades, el polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo es un anticuerpo (o porción o fragmento de este) que se une a un antígeno seleccionado de una clase de antígeno que incluye, por ejemplo, antígenos cancerosos, antígenos autoinmunes, alérgenos, y patógenos.

En ciertas modalidades, el polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo es un polipéptido de unión  $A\beta$ , por ejemplo, un anticuerpo  $A\beta$  (o porción o fragmento de éste). En algunas formulaciones, al menos un polipéptido de unión  $A\beta$  es un anticuerpo anti  $A\beta$ , por ejemplo, que se une específicamente al epítipo dentro de los residuos 1-7, 1-5, 3-7, 3-6, 13-28, 15-24, 16-24, 16-21, 19-22, 33-40, 33-42 de  $A\beta$ , o Fab, Fab'(2) o fragmento Fv de éste. Los anticuerpos anti  $A\beta$  de ejemplo se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 1-10 de  $A\beta$ , tal como, por ejemplo, dentro de los residuos 1-7, 1-5, 3-7, o 3-6 de  $A\beta$ . Otros anticuerpo anti  $A\beta$  de ejemplo se unen específicamente a un epítipo dentro de los residuos 13-28 de  $A\beta$ , tal como, por ejemplo, dentro de los residuos 16-21 o 19-22 de  $A\beta$ . Aún otros anticuerpos anti  $A\beta$  se unen específicamente a un epítipo terminal C de  $A\beta$  tal como, por ejemplo, 33-40 o 33-42 de  $A\beta$ . En una modalidad, el anticuerpo  $A\beta$  es un anticuerpo humanizado, por ejemplo, anticuerpo 3D6 humanizado, un anticuerpo 10D5 humanizado, un anticuerpo 12B4 humanizado, un anticuerpo 15C11 humanizado, o un anticuerpo 12A11 humanizado.

El polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste) puede estar presente desde aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml (por ejemplo, a aproximadamente 20 mg/ml o 30 mg/ml). El isotipo del anticuerpo puede ser IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub> o cualquier otro isotipo farmacéuticamente aceptable. En formulaciones

preferidas, el isotipo es IgG<sub>1</sub> humano o IgG<sub>4</sub> humano. En algunas formulaciones líquidas, la concentración del anticuerpo anti Aβ es de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml, a aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml, a aproximadamente 50 mg/ml, a aproximadamente 30 mg/ml, a aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml, a aproximadamente 20 mg/ml, a aproximadamente 17 mg/ml, a aproximadamente 10 mg/ml, a aproximadamente 5 mg/ml, a aproximadamente 2 mg/ml, o a aproximadamente 1 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml.

En ciertas modalidades, el manitol está presente en una cantidad suficiente para mantener la isotonicidad de la formulación. El manitol puede estar presente desde aproximadamente 2% p/v a aproximadamente 6% p/v (por ejemplo, a aproximadamente 4% p/v). En varias modalidades de los aspectos precedentes, la histidina puede estar presente en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado. La histidina (por ejemplo, L-histidina) puede estar presente desde aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 25 mM (por ejemplo, a aproximadamente 10 mM).

En otras modalidades, la formulación puede además incluir un antioxidante tal como metionina. La metionina puede estar presente en aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 25 mM (por ejemplo, a aproximadamente 10 mM). En una modalidad, en la formulación puede incluir un estabilizador tal como polisorbato 80. El polisorbato 80 puede estar presente desde aproximadamente 0.001% p/v a aproximadamente 0.01% p/v (por ejemplo, a aproximadamente 0.005% p/v). En ciertas modalidades, la formulación tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 (por ejemplo, aproximadamente 6).

En ciertas modalidades, la formulación puede ser estable para congelamiento. Adicionalmente, la formulación puede ser adecuada para administrarse parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intracranialmente, o epiduralmente. En varias modalidades, la formulación puede ser adecuada para suministro a blanco al cerebro o al fluido de la columna de un sujeto. En otras modalidades, la formulación puede estar sustancialmente libre de preservativos. La formulación puede ser estable durante al menos 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 24 meses, o al menos aproximadamente 30 meses. En varias modalidades, la formulación es estable a aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $40^{\circ}\text{C}$ , a aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$ , o a aproximadamente  $2^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $8^{\circ}\text{C}$ . Algunas formulaciones son estables durante al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 24 meses, o al menos aproximadamente 30 meses. Algunas formulaciones son estables a aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $40^{\circ}\text{C}$ , a aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$ , a aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $10^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente a aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $-50^{\circ}\text{C}$  o a aproximadamente  $2^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $8^{\circ}\text{C}$ . Algunas formulaciones son estables durante al menos 12 meses a una temperatura por encima de la de congelamiento a aproximadamente  $10^{\circ}\text{C}$  y tienen un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.5.

En un aspecto particular, la presente invención suministra una formulación adecuada para la administración intravenosa que incluye aproximadamente 20 mg/mL de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 4% de manitol y que tiene un pH de aproximadamente 6. En otro aspecto, la presente invención suministra una formulación adecuada para la administración intravenosa que incluye aproximadamente

20 mg/mL de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste, aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 4% de manitol, aproximadamente 0.01% de polisorbato 80, y que tiene un pH de aproximadamente 6. En otro aspecto, la presente invención suministra una formulación adecuada para la administración intravenosa que incluye aproximadamente 20 mg/mL de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de éste, aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 4% de manitol, aproximadamente 0.005% de polisorbato 80, y que tiene un pH de aproximadamente 6.

Algunas formulaciones son estables durante al menos aproximadamente 12 meses a una temperatura por encima del congelamiento a aproximadamente 10° C y que tiene un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.5. Tal formulación incluye al menos un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste) a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, manitol a una concentración de aproximadamente 4% p/v o NaCl a una concentración de aproximadamente 150 mM, de histidina o succinato a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM, y 10 mM de metionina. Una de tales formulaciones en un pH de aproximadamente 6.0, aproximadamente 1 mg/ml de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste) aproximadamente 10 mM de histidina y aproximadamente 4% p/v de manitol. Otras formulaciones son estables durante al menos aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2° C a 8° C, e incluye polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0.001% p/v a aproximadamente 0.01% p/v. Algunas de tales formulaciones tienen un pH de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 6.5 e incluyen aproximadamente 10 mM de histidina,

aproximadamente 4% p/v de manitol y aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml o aproximadamente 5 mg/ml de un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste). Otras de tales formulaciones incluyen aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 4% p/v de manitol, aproximadamente 0.005% p/v polisorbato 80 y aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml o 30 mg/ml de un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), preferiblemente a un pH de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 6.2.

Un comulación preferida es estables durante menos de aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2° C a aproximadamente 8° C, tiene un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.5, e incluye aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml, de un anticuerpo 3D6 humanizado, aproximadamente 10 mM de histidina y aproximadamente 10 mM de metionina. Preferiblemente, la formulación incluye además aproximadamente 4% p/v de manitol. La formulación incluye preferiblemente polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0.001% p/v a aproximadamente 0.01% p/v, más preferiblemente aproximadamente 0.005% p/v polisorbato 80. En tales formulaciones, el anticuerpo 3D6 humanizado puede estar presente en una concentración de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml.

Otra formulación es estable durante al menos 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2° C a aproximadamente 8° C, tiene un pH de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.5, e incluye aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml de un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo,

fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), aproximadamente 10 mM de succinato, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 4% p/v de manitol y aproximadamente 0.005% p/v polisorbato 80. En algunas de tales formulaciones, la concentración del polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activa (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste) está presente en una concentración de aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml.

La invención también suministra una formulación que es estable cuando se descongela desde aproximadamente  $-50^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$ , tiene un pH de aproximadamente 6.0 e incluye aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mg/ml de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), aproximadamente 1.0 mg/ml a aproximadamente 2.0 mg/ml de histidina, aproximadamente 1.0 mg/ml a 2.0 mg/ml de metionina y aproximadamente 0.05 mg/ml de polisorbato 80. Preferiblemente, se excluye el manitol.

La presente invención también suministra una formulación líquida que incluye un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), manitol e histidina. En algunas de tales formulaciones, el polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), se presenta desde aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml. Preferiblemente, el manitol está presente en una cantidad suficiente para mantener la isotonicidad de la formulación. Preferiblemente, la histidina está presente en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado. Una de tales formulaciones incluye aproximadamente 20 mg/mL de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste),

aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 4% de manitol y tiene un pH de aproximadamente 6. Otra de tales formulaciones incluye aproximadamente 30 mg/mL de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), aproximadamente 10 mM de succinato, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 6% de manitol y tiene un pH de aproximadamente 6.2. Aún otra de tales formulaciones incluye aproximadamente 20 mg/mL de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 4% de manitol, aproximadamente 0.005% de polisorbato 80, y tiene un pH de aproximadamente 6. Otra de tales formulaciones incluye aproximadamente 10 mg/mL de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), aproximadamente 10 mM de succinato, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 10% de manitol, aproximadamente 0.005% de polisorbato 80, y tiene un pH de aproximadamente 6.5.

Aún otra de tales formulaciones incluye aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 4% de manitol, aproximadamente 0.005% de polisorbato 80, y tiene un pH de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 6.5. Aún otra de tales formulaciones incluye aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), aproximadamente a 5 mM a aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina,

aproximadamente 150 mM de NaCl, aproximadamente 0.005% de polisorbato 80, y tiene un pH de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 6.5.

La presente invención también suministra una formulación adecuada para la administración intravenosa que incluye aproximadamente 20 mg/mL de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 4% de manitol y tiene un pH de aproximadamente 6. Preferiblemente, tal formulación incluye aproximadamente 0.005% de polisorbato 80.

La invención suministra un método para incrementar la estabilidad de un polipéptido de unión de antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, una formulación farmacéutica líquida, donde el polipéptido exhibiría de otra forma una formación de subproducto durante el almacenamiento de una formación líquida. De acuerdo con esto, el método comprende incorporar en la formulación un antioxidante, por ejemplo, metionina o un análogo de éste, en una cantidad suficiente para reducir la cantidad de formación de subproducto.

La presente invención también suministra un método para mantener la estabilidad de un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste) la formulación a ser almacenada a una temperatura de aproximadamente  $-50^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$  seguida por almacenamiento a una temperatura de aproximadamente  $2^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $8^{\circ}\text{C}$ , que comprende (i) combinar aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml de un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste),

aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml de L-histidina, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml de metionina y aproximadamente 0.05 mg/ml de polisorbato 80; (ii) ajustar el pH a aproximadamente 6.0; (iii) filtrar en un criorecipiente y congelar; (iv) descongelar; (v) agregar manitol o NaCl y un diluyente en cantidades suficientes para resultar en una concentración final de aproximadamente 4% de manitol o aproximadamente 150 mM de NaCl, aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml de un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste); aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM de histidina; aproximadamente 10 mM de metionina y aproximadamente 0.005% de polisorbato 80; (vi) filtrar; (vii) transferir a un recipiente de vidrio y sellar; y (viii) almacenar a una temperatura de aproximadamente 2° C a aproximadamente 8° C.

La presente invención también suministra un kit que incluye un recipiente con una formulación descrita aquí e instrucciones para uso.

La presente invención también suministra una forma de dosis unitaria farmacéutica, que incluye una formulación de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 250 mg de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), aproximadamente 4% de manitol o aproximadamente 150 mM de NaCl, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM de histidina o succinato, y aproximadamente 10 mM de metionina. Algunas de tales formas de dosis unitarias farmacéuticas incluyen aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.1% de polisorbato 80. Algunas de tales formas de dosis unitarias farmacéuticas incluyen aproximadamente 40 mg a aproximadamente 60 mg, aproximadamente 60 mg a aproximadamente 80 mg, aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg, aproximadamente 120 mg a

aproximadamente 160 mg, o aproximadamente 160 mg a aproximadamente 240 mg del polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste). Algunas de tales formulaciones se pueden mantener en un recipiente de vidrio a una temperatura de aproximadamente 2° C a aproximadamente 8° C antes de la administración a un paciente.

Además, la presente invención suministra un producto terapéutico que incluye un frasco de vidrio con una formulación que incluye aproximadamente 10 mg a aproximadamente 250 mg de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), aproximadamente 4% de manitol o aproximadamente 150 mM de NaCl, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM de histidina, y aproximadamente 10 mM de metionina. Alguno de tales productos terapéuticos incluyen además una etiqueta para uso que incluye instrucciones para usar el volumen apropiado necesario para lograr una dosis de aproximadamente 0.15 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg en un paciente. Típicamente, el frasco es un frasco de un 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL o 50 mL. La dosis de algunas de tales productos terapéuticos es aproximadamente 0.5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, preferiblemente aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg. En algunos de tales productos terapéuticos, la concentración de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste) es aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 20 mg/ml. El producto terapéutico preferiblemente incluye aproximadamente 0.005% de polisorbato 80. La formulación de algunos de tales productos terapéuticos es para administración subcutánea o administración intravenosa.

En otro aspecto, la invención suministra un método para incrementar la estabilidad de un polipéptido de unión de antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, una formulación farmacéutica líquida, donde el polipéptido exhibiría de otra forma formación de subproducto durante el almacenamiento de una formulación líquida. De acuerdo con esto, el método comprende incorporar en la formulación un antioxidante, por ejemplo, metionina o un análogo de ésta, en una cantidad suficiente para reducir la cantidad de formación de subproducto.

En aún otro aspecto, la presente invención suministra un kit que incluye un recipiente con una formulación descrita aquí e instrucciones para uso.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 describe una representación esquemática de la estructura predicha de un anticuerpo IgG y posiciones aproximadas de uniones disulfuro intra- e intercadena, sitios de glicosilación (símbolo hexagonal), regiones determinantes de complementariedad (CDR), regiones de estructura (sombreadas), y regiones constantes.

La Figura 2 identifica la secuencia de aminoácido completa de las cadenas ligeras y pesada del anticuerpo anti A $\beta$  3D6 versión 2 humanizadas (hu3D6.v2), SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente. Regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (CDR), es decir, CDR1, CDR2, y CDR3 están, respectivamente, en las

posiciones del residuo 24-39, 55-61, y 94-102 (panel superior). Las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR), es decir, CDR1, CDR2, y CDR3 están, respectivamente, en las posiciones de residuo 40-44, 50-65, y 99-108 (panel inferior). Las uniones disulfuro intramoleculares predichas se ilustran por medio de conexiones de los residuos de cisteína involucrados. Las cisteínas esperadas para formar las uniones disulfuro intramolecular están subrayadas y la conectividad indicada. El sitio de consenso de glicosilación ligado a N de la cadena pesada de anticuerpo indicada en cursiva y negrilla en las posiciones de residuo 299-301 (panel interior). La lisina C-terminal de cadena pesada predicha se muestra en paréntesis.

La Figura 3 describe gráficamente las predicciones de vida útil para las formulaciones de anticuerpo (con y sin polisorbato 80 (PS80)) hecho de acuerdo con la presente invención y almacenada a 5° C.

La Figura 4 describe gráficamente las predicciones de vida útil para formulaciones de anticuerpo (con y sin PS80) hecho de acuerdo con la presente invención y almacenada a 25° C.

La Figura 5 describe gráficamente las predicciones de vida útil para formulaciones de anticuerpo (con y sin PS80) hecho de acuerdo con la presente invención y almacenada a 40° C.

La Figura 6 describe gráficamente las predicciones de degradación para las formulaciones con PS80 hecho de acuerdo con la presente invención y almacenada a 5° C.

La Figura 7 describe gráficamente el análisis de cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) de las formulaciones con PS80 hecho de acuerdo con la presente invención, almacenada a 5° C, y reprocesada para minimizar la variabilidad de ensayo.

La Figura 8 describe gráficamente las predicciones de degradación de formulaciones sin PS80 hecho en de acuerdo con la presente invención y almacenada a 5° C.

La Figura 9 describe un cromatograma que indica que la presencia del PS80 cambia los subproductos encontrados dentro de la formulación de polipéptido estabilizada desde especies de alto peso molecular a especies de bajo peso molecular sin cambiar el perfil del anticuerpo de monómero.

La Figura 10 describe gráficamente la inhibición de la formación de los subproductos indeseables en una formulación de polipéptido que comprende IgG4, en particular, agregados de polipéptido de alto peso molecular, luego de la adición de un antioxidante tal como metionina libre.

La Figura 11 describe gráficamente la inhibición de la formación de subproductos indeseables en una formulación de polipéptido que comprende IgG2, en particular, agregados de polipéptido de alto peso molecular, luego de la adición de un antioxidante tal como metionina libre.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

Con el fin de suministrar un entendimiento claro de las especificaciones y reivindicaciones, las siguientes definiciones se suministran convenientemente adelante.

Como se utiliza aquí, el término “polipéptido de unión de antígeno” incluye polipéptidos capaces de unirse específicamente a la molécula objetivo, por ejemplo, un antígeno, por ejemplo, un Péptido A $\beta$  (s) o epítipo(s) dentro de dichos Péptidos A $\beta$ . Típicamente, los polipéptidos de unión de antígeno comprenden al menos una porción funcional de una inmunoglobulina o un dominio similar a inmunoglobulina (por ejemplo, un receptor) que comprende una o más regiones de variabilidad o regiones determinantes de complementariedad (CDR) que imparten una característica de unión específica al polipéptido. Los polipéptidos de unión de antígeno preferidos incluyen anticuerpos, por ejemplo, IgM, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4.

El término “anticuerpo” incluye anticuerpos monoclonales (que incluye anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos quiméricos, anticuerpos infectados con CDR, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y anticuerpos de cadena simple (scFvs). El término “anticuerpo de cadena simple” se refiere a una proteína que tiene una estructura de cadena de dos polipéptidos que consisten de una cadena pesada y una ligera, dichas cadenas son estabilizadas, por ejemplo, mediante ligadores de péptido intercadena, que tiene la capacidad de unirse específicamente a antígeno. El término “fragmento de anticuerpo” incluye fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos, Fab, fragmentos Fd, fragmentos Fv, y fragmentos de anticuerpo de dominio simple (DABs).

El término “dominio” se refiere a una región globular de polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende un pliegue de inmunoglobulina. El pliegue de inmunoglobulina está comprendido de una estructura secundaria de lámina plegada  $\beta$  que incluye un enlace disulfuro. Los dominios son además denominados aquí como “constante” o “variable”, con base en la falta relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio “constante”, o la variación significativa dentro de los dominios de varias clases de varios miembros en la clase en el caso de un dominio “variable”. Los “dominios” de anticuerpo o polipéptido son a menudo denominados intercambiamente en la técnica como “regiones” de anticuerpo o polipéptido. Los dominios “constante” de una cadena ligera de anticuerpo son denominados intercambiamente como “regiones constantes de cadena ligera”, “dominios constantes de cadena ligera”, regiones “CL” o dominios “CL”. Los dominios “constante” de una cadena pesada de anticuerpo son denominados intercambiamente como “regiones constantes de cadena pesada”, “dominios constantes de cadena”, regiones “CH” o dominios “CH”). Los dominios “variable” de una cadena ligera de anticuerpo son denominados intercambiamente como “regiones variables de cadena ligera”, “dominios variables de cadena ligera”, regiones “VL” o dominios “VL”). Los dominios “variable” de una cadena pesada de anticuerpo son denominados intercambiamente como “regiones constantes de cadena pesada”, “dominios constantes de cadena pesada”, regiones “VH” o dominios “VH”).

El término “región” se puede referir una parte o porción de una cadena de anticuerpo o un dominio de cadena de anticuerpo (por ejemplo, una parte o porción de una cadena pesada o ligera o una parte o porción de un dominio constante o variable, como se definió aquí), así compuesto también a partes o porciones más discretas de dichas cadenas o dominios. Por ejemplo, las cadenas ligera y pesada o los dominios de variable de cadena ligera y pesada incluyen “regiones determinantes

complementariedad" o "CDR" esparcidos entre las "regiones de estructura" o "FR", como se definió aquí.

El término "anticuerpo anti A $\beta$ " incluye anticuerpos (y fragmentos de éstos) que son capaces de unirse a epítipo (s) del péptido A $\beta$ . Los anticuerpo anti A $\beta$  incluyen, por ejemplo, aquellos anticuerpos descritos en la Solicitud de Patente U.S. No. 20030165496A1, la Publicación de Patente U.S. No. 20040087777A1, la Publicación de Patente Internacional No. WO02/46237A3, y la Publicación de Patente Internacional No. WO04/080419A2. Otros anticuerpos anti A $\beta$  se describen en, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales Nos. WO03/077858A2 y WO04/108895A2, ambas titulas "Humanized Antibodys que Recognize Beta Amiloide Péptido", la Publicación de Patente Internacional No. WO03/016466A2, titulada "Anticuerpos anti-A $\beta$ ", la Publicación de Patente Internacional No. WO0162801A2, titulada "Humanized Antibodys that Sequester Amyloid Beta Peptide", y la Publicación de Patente Internacional No. WO02/088306A2, titulada "Anticuerpos Humanizados".

El término "fragmento" se refiere a una parte o porción de un anticuerpo o cadena de anticuerpo que comprende más pocos residuos de aminoácidos que un anticuerpo intacto o completo o una cadena de anticuerpo. Los fragmentos se pueden obtener por vía de un tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo intacto o completo o una cadena de anticuerpo. Los fragmentos también se pueden obtener mediante medios recombinantes. Fragmentos de ejemplo incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y/o fragmentos Fv. El término "fragmento de unión de antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que se une al antígeno o compite con anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del cual ellos se derivaron) para la unión de antígeno (es decir, la unión específica).

El término “conformación” se refiere a la estructura terciaria de una proteína o polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo, una cadena de anticuerpo, dominio o región de ésta). Por ejemplo, la frase “conformación de cadena ligera (o pesada)” se refiere a la estructura terciaria de una región variable de cadena ligera (o pesada), y la frase “conformación de anticuerpo conformación” o “conformación de fragmento de anticuerpo” se refiere a la estructura terciaria de un anticuerpo o fragmento de este.

“Unión específica” de un anticuerpo significa que el anticuerpo exhibe afinidad apreciable por el antígeno o epítipo particular y, en general, no exhibe reactividad cruzada significativa. En las modalidades de ejemplo, el anticuerpo no exhibe reactividad cruzada (por ejemplo, no reacciona de manera cruzada con péptidos no A $\beta$  o con epítopos remotos por ejemplo, epítopos no contiguos de A $\beta$ ). “Apreciable” o de unión preferida incluye unión con una afinidad de al menos  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  M $^{-1}$ , o  $10^{10}$  M $^{-1}$ . Las afinidades mayores de  $10^7$  M $^{-1}$ , preferiblemente mayores de  $10^8$  M $^{-1}$  son las más preferidas. Los valores intermedios de aquellos establecidos aquí también pueden estar dentro del alcance de la presente invención y una afinidad de unión preferida se puede indicar compuesto un rango de afinidades, por ejemplo,  $10^6$  a  $10^{10}$  M $^{-1}$ , preferiblemente  $10^7$  a  $10^{10}$  M $^{-1}$ , más preferiblemente  $10^8$  a  $10^{10}$  M $^{-1}$ . Un anticuerpo que “no exhiba reactividad cruzada significativa” es uno que no se unirá apreciablemente a una entidad indeseable (por ejemplo, a una proteína indeseable, polipéptido o péptido). Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a A $\beta$  se unirá apreciablemente a A $\beta$  pero no reaccionará significativamente con proteínas o péptidos no-A $\beta$  (por ejemplo, proteínas o péptidos no-A $\beta$  incluidos en placas). Un anticuerpo específica para un epítipo particular, por ejemplo, no reaccionará de manera cruzada significativamente con epítopos remotos sobre la misma proteína o péptido. La unión específica se puede determinar de acuerdo a cualesquier medios reconocidos en la técnica para determinar tal unión. Preferiblemente, la unión específica se determina de acuerdo al análisis Scatchard y/o los ensayos de modo competitivos.

Los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinantes, o mediante clivaje enzimático o químico de inmunoglobulinas intactas. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, cadenas simples, y anticuerpos de cadena simple. Diferentes a las inmunoglobulinas o anticuerpos "biespecífico" o "bifuncional", una inmunoglobulina o anticuerpo se entiende por tener cada uno de sus sitios de unión idéntico. Un "biespecífico" o "anticuerpo bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos diferentes pares de cadena pesada/ligera y dos diferentes sitios de unión. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante una variedad de métodos que incluyen fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Ver, *por ejemplo*, Songvilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

Un "antígeno" es una molécula (por ejemplo, una proteína, polipéptido, péptido o carbohidrato) que contiene un determinante antigénico al cual se une específicamente el anticuerpo.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al cual una inmunoglobulina o anticuerpo (o fragmento de unión de antígeno de éste) se une específicamente. Los epítipos se pueden formar tanto de aminoácidos contiguos como aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante pliegues terciarios de una proteína. Los epítipos formados de aminoácidos contiguos son típicamente retenidos sobre exposición a solventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados mediante pliegue terciario son típicamente perdidos en el tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítipo típicamente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen, por ejemplo,

cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bi-dimensional. Ver, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

El término “formulación estabilizada” o “formulación de polipéptido líquido estabilizado” incluye formulaciones en las cuales el polipéptido allí retiene esencialmente su identidad física y química y la integridad luego de almacenamiento. Varias técnicas analíticas para la medición de la estabilidad de la proteína están disponibles en la técnica y se describen aquí (revisado en, *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) and Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993)). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Para un ensayo rápido, la formulación se puede mantener a una temperatura mayor o “acelerada”, por ejemplo, 40° C durante 2 semanas o 1 mes o más en cuyo tiempo se mide la estabilidad. En modalidades de ejemplo, la formulación es refractaria a la formación de subproductos de el polipéptido componente, por ejemplo, productos de agregación de alto peso molecular, productos de degradación o fragmentación de bajo peso molecular, o mezclas de éstos.

El término “subproducto” incluye productos indeseados, que afectan, o disminuye la proporción del polipéptido terapéutico en una formulación dada. Los subproductos típicos incluyen agregados del polipéptido terapéutico, los fragmentos del polipéptido terapéutico (por ejemplo, producidos mediante la degradación del polipéptido mediante la desamidación o hidrólisis), o mezclas de éstos.

El término “agregados de polipéptido de alto peso molecular” incluye agregados de polipéptido terapéutico, fragmentos del polipéptido terapéutico (por ejemplo,

producidos mediante la degradación de polipéptido mediante, por ejemplo, hidrólisis), o mezclas de éstos, que se agregan luego.. Típicamente, los agregados de alto peso molecular son complejos los cuales tienen un peso molecular que es mayor que el polipéptido monómero terapéutico. En el caso de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo IgG, tales agregados son mayores que aproximadamente 150 kD. Sin embargo, en el caso de éstos polipéptidos terapéuticos, por ejemplo, anticuerpos de cadena simple, que típicamente tienen un peso molecular de 25 kD, tales agregados tendría un peso molecular mayor de aproximadamente 25 kD.

El término "producto de degradación de polipéptido de bajo peso molecular" incluye, por ejemplo, fragmentos del polipéptido terapéutico, por ejemplo, llevados por la desamidación o hidrólisis. Típicamente, los productos de degradación de bajo peso molecular son complejos que tienen un peso molecular que es menor del polipéptido de monómero terapéutico. En el caso de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo IgG, tales productos de degradación son menos desde aproximadamente 150 kD. Sin embargo, en el caso de éstos polipéptido terapéuticos, por ejemplo, los anticuerpos de cadena simple, que tienen típicamente un peso molecular de 25 kD, tales agregados tendrían un peso molecular de menos de aproximadamente 25 kD.

El término "ruta de administración" incluye rutas de administración reconocidas en la técnica para el suministro de polipéptido terapéuticos tales como, por ejemplo, parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intracranealmente, o epiduralmente. Para la administración de un polipéptido terapéutico, para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, se pueden desear rutas intravenosas, epidurales, o intracraneales.

El término “enfermedad amiloidogénica” incluye cualquier enfermedad asociada con (o causada por) la formación o depósito de fibrillas amiloides insolubles. Ejemplos de enfermedad amiloidogénicas incluyen, pero no están limitadas a amiloidosis sistémica, enfermedad de Alzheimer, diabetes de ataque maduro, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, demencia fronto-temporal, encefalitis espongiforme transmisible almacenada con pieles (enfermedad de kuru y Creutzfeldt-Jacob en humanos y encefalopatía espongiforme en BSE en ovejas y ganado, respectivamente). Las enfermedades amiloidogénicas son definidas o caracterizadas por la naturaleza del componente polipéptido de las fibrillas depositadas. Por ejemplo, en sujetos o pacientes que tienen enfermedad de Alzheimer, la proteína  $\beta$ -amiloide (por ejemplo, tipo silvestre, variante, o proteína  $\beta$ -amiloide truncada) es el componente polipéptido que caracteriza el depósito amiloide. De acuerdo con esto, la enfermedad de Alzheimer es un ejemplo de una “enfermedad caracterizada por depósitos de  $A\beta$ ” o una “enfermedad asociada con depósitos de  $A\beta$ ”, por ejemplo, en el cerebro de un sujeto o paciente.

Los términos “proteína  $\beta$ -amiloide”, “péptido  $\beta$ -amiloide”, “ $\beta$ -amiloide”, “ $A\beta$ ” y “péptido  $A\beta$ ” se usan intercambiabilmente aquí.

El término “tratamiento” como se utiliza aquí, se define como la aplicación o administración de un agente terapéutico a un paciente, o la aplicación o administración de un agente terapéutico a un tejido aislado a una línea celular de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el propósito de cura, sanar, aliviar, retrasar, mejorar, alterar, remediar, mejorar, alentar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

El término "dosis efectiva" o "dosificación efectiva" se define como una cantidad suficiente para lograr al menos parcialmente el efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente efectiva" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos disminuir parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya sufre de la enfermedad. Cantidades efectivas para este uso dependerán de la severidad de la infección y el estado general del sistema inmune propio del paciente.

El término "paciente" incluye sujetos humanos u otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

El término "forma de dosis unitaria" (o "forma de dosificación unitaria") como se utiliza aquí se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada como dosis unitarias para los paciente a ser tratados, cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con los vehículos farmacéuticos requeridos, diluyentes, o excipientes. La especificación para las formas unitarias de dosis de la invención están dictadas por y directamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular a ser logrado, y los parámetros conocidos en la técnica de compuestos tales como compuesto activo para el tratamiento de pacientes.

Los niveles de dosis actual dosis del ingrediente de activo (por ejemplo  $A\beta$  polipéptidos) en las formulaciones de la presente invención se pueden variar con el fin de obtener una cantidad del ingrediente de activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, la composición, el modo de administración, sin ser tóxicos al paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, la ruta de

administración, el tiempo de administración; la tasa de excreción del compuesto particular que está siendo empleado, la duración del tratamiento, otras drogas, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia clínica anterior del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las ciencias médicas.

El término "diluyente" como se utiliza aquí se refiere a una solución adecuada para alentar o lograr una concentración de ejemplo o apropiada, o concentración como se describió aquí.

## **REVISIÓN**

La presente invención suministra formulaciones para polipéptidos de unión de antígeno, en particular, anticuerpos, así como también porciones y/o fragmentos de éstos. En ciertos aspectos, la invención suministra formulaciones de polipéptido líquido estabilizadas para uso terapéutico. En particular, la invención suministra la estabilización de polipéptidos de unión de antígeno, por ejemplo, anticuerpos, y fragmentos unión de antígeno de éstos, para el uso en el tratamiento de enfermedades y/o trastornos. En particular, la invención suministra formulaciones que son estabilizadas de tal forma que el polipéptido terapéutico activo es estable durante un periodo extendido de tiempo y puede ser administrado a través de una variedad de rutas de administración. Este es especialmente crítico para aquellos polipéptidos de unión de antígeno (por ejemplo, anticuerpos) destinados para el uso en el tratamiento de ciertas enfermedades y/o trastornos, por ejemplo, enfermedad neurológica o afección neurológica. En otros aspectos, la invención suministra una formulación de anticuerpo estable única que, por ejemplo, es estable a varias agresiones tales como

congelamiento, liofilización, calor y/o reconstitución. Más aún, las formulaciones de ejemplo de la presente invención son capaces de mantener la estabilidad, la actividad biológica, la pureza y calidad del anticuerpo durante un periodo de tiempo extendido y aún a temperaturas desfavorables (por ejemplo, un año durante el cual la formulación se almacena). Además, las formulaciones de ejemplo de la presente invención son adecuadas para la administración a sujeto o paciente (por ejemplo, administración intravenosa a un sujeto o paciente), por ejemplo, un humano que tiene o se predice que tiene una enfermedad o afección neurológica, por ejemplo, enfermedad amiloidogénica que involucra el polipéptido A $\beta$  amiloide.

## **FORMULACIONES**

En un aspecto, la presente invención suministra una formulación que incluye un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, un fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de éste), un agente de tonicidad (por ejemplo, manitol), donde el agente de tonicidad está presente en una cantidad suficiente para hacer la formulación adecuada para infusión intravenosa, y un aminoácido (por ejemplo, histidina) o derivado de éste, donde el aminoácido o derivado de éste está presente en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado. En una modalidad de ejemplo, la presente invención suministra una formulación que incluye un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de éste), manitol e histidina.

En otro aspecto, la presente invención suministra una formulación estabilizada que incluye un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo. Los polipéptidos de unión de antígeno adecuados para la estabilización en una formulación de la invención incluyen anticuerpos y fragmentos de éstos, y en particular, anticuerpos

capaces de unirse a un blanco terapéutico involucrado en enfermedad o trastorno. De acuerdo con esto, los polipéptido terapéuticos se estabilizan de acuerdo con la invención para evitar la formación de subproductos, típicamente agregados de alto peso molecular, fragmentos de degradación de bajo peso molecular, o mezclas de éstos, mediante la adición de un antioxidante en una cantidad suficiente con el fin de inhibir la formación de tales subproductos. Los agentes antioxidantes incluyen metionina y análogos de éstos, a concentraciones suficientes para obtener la inhibición deseada de los subproductos indeseables como se discute adelante. Opcionalmente, las formulaciones de polipéptido estabilizadas de la invención comprenden además un agente de tonicidad (por ejemplo, manitol), donde el agente de tonicidad está presente en una cantidad suficiente para hacer la formulación adecuada para varias diferentes rutas de administración, por ejemplo, la infusión intravenosa, y un aminoácido (por ejemplo histidina) o derivado de este, donde el aminoácido o derivado de este está presente en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado. En una modalidad de ejemplo, la presente invención suministra una formulación que incluye un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo, metionina, manitol e histidina.

#### Polipéptidos para uso en las Formulaciones de la Invención

El polipéptido a ser formulado de acuerdo con la invención como se describió aquí se prepara utilizando técnicas que están bien establecidas en el arte e incluyen, por ejemplo, técnicas sintéticas (tales como técnicas recombinantes y síntesis de péptido o combinación de estas técnicas), o se puede aislar de una fuente endógena del polipéptido. En ciertas modalidades de la invención, el polipéptido de elección es un polipéptido de unión de antígeno, más preferiblemente, un anticuerpo, y en particular,

un anticuerpo anti-A $\beta$ . Las técnicas para la producción del polipéptido de unión de antígeno, y en particular, los anticuerpos, se describen adelante.

### Anticuerpos

El término “anticuerpo” como se utiliza aquí se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión de antígeno que se unen específicamente (reconoce) un antígeno. Ejemplos de porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub> que se generan al tratar el anticuerpo con una enzima tal como pepsina o producidos mediante técnicas de ingeniería recombinantes reconocidas en el arte. Las modalidades de la invención son relevantes para la estabilización de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen a un antígeno, por ejemplo un antígeno blanco terapéutico, tal como, A $\beta$ . El término “anticuerpo monoclonal” o “formulación de anticuerpo monoclonal”, como se utiliza aquí, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solamente una especie de un sitio de unión de antígeno capaz de reconocer y unirse a un epítipo particular epítipo de un antígeno blanco, por ejemplo, un epítipo(s) de A $\beta$ . Una formulación de anticuerpo monoclonal despliega así típicamente una especificidad de unión simple y afinidad para un antígeno blanco particular con el cual éste inmunoreacciona.

### Anticuerpos Policlonales

Los anticuerpos policlonales se puede preparar como se describió anteriormente al inmunizar un sujeto adecuado con un inmunógeno. El título de anticuerpo en el sujeto inmunizado se puede monitorear durante el tiempo mediante técnicas estándar, tales

como con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) utiliza antígeno blanco inmovilizado. Si se desea, las moléculas de anticuerpo dirigidas contra el antígeno blanco se pueden aislar del mamífero (por ejemplo, de la sangre) y además purificar mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía de Sefarosa<sup>TM</sup> de proteína para obtener el anticuerpo, por ejemplo, IgG, fracción. En un tiempo apropiado después de inmunización, por ejemplo, cuando los títulos de anticuerpo anti-antígeno son más altos, las células que producen anticuerpos se pueden obtener del sujeto y utilizar para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándar, tales como la técnica de hibridoma originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497) (ver también, Brown *et al.* (1981) *J. Immunol.* 127:539-46; Brown *et al.* (1980) *J. Biol. Chem.* 255:4980-83; Yeh *et al.* (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:2927-31; and Yeh *et al.* (1982) *Int. J. Cancer* 29:269-75). Para la preparación de los anticuerpos policlonales quiméricos, ver Buechler *et al.* Patente U.S. No. 6,420,113.

### Anticuerpos Monoclonales

Cualquiera de los muchos protocolos bien conocidos utilizados para fusionar linfocitos y líneas celulares immortalizadas se pueden aplicar para el propósito de generar un anticuerpo monoclonal (ver, por ejemplo, G. Galfre *et al.* (1977) *Nature* 266:55052; Gefter *et al.* *Somatic Cell Genet.*, cited *supra*; Lerner, *Yale J. Biol. Med.*, cited *supra*; Kenneth, *Monoclonal Antibodies*, citados *supra*). Más aún, el trabajador experto apreciará que existen muchas variaciones de tales métodos que serían útiles. Típicamente, la línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma) se deriva de las mismas especies de mamífero como los linfocitos. Por ejemplo, los hibridomas de murino pueden hacer al fusionar linfocitos de un ratón inmunizado con una preparación inmunogénica de la presente invención con una línea celular de ratón immortalizada. Las líneas celulares inmortales preferidas son líneas de células de

mieloma de ratón que son sensibles a hipoxantina contenida en medio de cultivo, aminopterina y timidina (medio "HAT"). Cualquiera de un número de líneas celulares de mieloma se pueden utilizar como un compañero de fusión de acuerdo a técnicas estándar, por ejemplo, las líneas de mieloma P3-NS1/1-Ag4-1, P3-x63-Ag8.653 o Sp2/O-Ag14. Estas líneas de mieloma están disponibles del ATCC. Típicamente, las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan a esclerosis de ratón que utilizan polietilenglicol ("PEG"). Las células de hibridoma que resultan de la fusión son entonces seleccionadas utilizando medio HAT, que mata las células de mieloma no fusionadas o improproductivamente fusionadas (esclerosis no fusionados muertos después de varios días por que ellos no son transformados). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan al seleccionar los sobrenadantes de cultivos de hibridoma para los anticuerpos que se unen a un antígeno blanco, por ejemplo,  $A\beta$ , utilizando un ensayo ELISA estándar.

#### Anticuerpos Recombinantes

Las alternativas para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, un anticuerpo monoclonal se puede identificar y aislar al seleccionar una librería de inmunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo, una librería de despliegue de fago de anticuerpo) con un antígeno blanco para aislar de esta manera miembros de librería de inmunoglobulina que se unen a un antígeno blanco. Kits para generar y seleccionar librerías de despliegue de fago y disponibles comercialmente (por ejemplo, (the Pharmacia *Recombinant Fage Antibody System*, Catalog No. 27-9400-01; y el Stratagene SurfZAP™ Fage Display Kit, Catalogo No. 240612). Adicionalmente, ejemplos y métodos de reactivos particularmente adecuados para uso para generar y seleccionar librería de despliegue de anticuerpos se puede encontrar en, por ejemplo, Ladner *et al.* Patente U.S. No. 5,223,409; Kang *et al.* Publicación de Patente

Internacional PCT No. WO 92/18619; Dower *et al.* Publicación de Patente Internacional PCT No. WO 91/17271; Winter *et al.* Publicación de Patente Internacional PCT WO 92/20791; Markland *et al.* Publicación de Patente Internacional PCT No. WO 92/15679; Breitling *et al.* Publicación de Patente Internacional PCT WO 93/01288; McCafferty *et al.* Publicación de Patente Internacional PCT No. WO 92/01047; Garrard *et al.* Publicación de Patente Internacional PCT No. WO 92/09690; Ladner *et al.* Publicación de Patente Internacional PCT No. WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins *et al.* (1992) *J. Mol. Biol.* 226:889-896; Clarkson *et al.* (1991) *Nature* 352:624-628; Gram *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580; Garrad *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Hoogenboom *et al.* (1991) *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137; Barbas *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982; and McCafferty *et al.* *Nature* (1990) 348:552-554.

#### Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

Adicionalmente, los anticuerpo recombinantes, tales como los anticuerpos quiméricos y monoclonales humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que se pueden utilizar usando técnicas de ADN recombinante estándar, que están dentro del alcance de la invención.

El término "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una inmunoglobulina humanizada o una cadena de anticuerpo (es decir, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). El término "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpo humanizado" (es decir una "cadena ligera de inmunoglobulina humanizada" o "cadena pesada de inmunoglobulina humanizada") se refiere a una

cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (es decir, una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región de estructura variable sustancialmente de una inmunoglobulina humana o un anticuerpo y regiones determinantes de complementariedad (CDR) (por ejemplo, al menos un CDR, preferiblemente dos CDR, más preferiblemente tres CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano, y además incluye regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o porción de ésta, y en el caso de una cadena ligera, y preferiblemente tres regiones constantes en el caso en donde una cadena pesada). El término "región variable humanizada" (por ejemplo, "región variable de cadena ligera humanizada" o "región variable de cadena pesada humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región de estructura variable sustancialmente de una inmunoglobulina humana o anticuerpo y regiones determinantes de complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.

La frase "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano" o "sustancialmente humano" significa que, cuando se alinea a una inmunoglobulina humana o a una secuencia amino de anticuerpo para propósitos de comparación, la región comparte al menos 80-90%, 90-95%, o 95-99% de identidad (es decir identidad de secuencia local) con la estructura humana o la secuencia de región constante, permitiendo, por ejemplo, las sustituciones conservadoras, las sustituciones de secuencia de consenso, las sustituciones de línea germinal, la retromutaciones, y similares. La introducción de sustituciones conservadoras, sustituciones de secuencia de consenso, sustituciones de línea germinal, retromutaciones, y similares, se denominan a menudo como "optimización" de un anticuerpo humanizado o cadena. La frase "sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano" o "sustancialmente no humano" significa que tiene una secuencia de inmunoglobulina o anticuerpo de al menos 80-95%, preferiblemente al menos 90-95%, más

preferiblemente, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica con aquella del organismo no humano, por ejemplo un mamífero no humano.

De acuerdo con eso, todas las regiones o residuos de la inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, o de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizado, excepto los CDR, son sustancialmente idénticos a las regiones correspondientes o a los residuos de uno o más secuencias de inmunoglobulina humana. El término "región correspondiente" o "residuo correspondiente" se refiere a una región o residuo sobre un segundo aminoácido o secuencia de nucleótido que ocupa la misma (es decir equivalente) posición que la región o residuo sobre un primer aminoácido o secuencia de nucleótido, cuando la primera y segunda secuencias están óptimamente alineadas para propósitos de comparación.

El término "identidad significativa" significa que dos secuencias de polipéptido, cuando están óptimamente alineadas, tales como mediante los programas GAP o BESTFIT que utilizan pesos de espacio por defecto, combaten al menos 50-60% de la identidad de secuencia, preferiblemente al menos 60-70% de la identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 70-80% de la identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 80-90% de identidad, y aún más preferiblemente al menos 90-95% de la identidad de secuencia, y aún más preferiblemente al menos 95% de la identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99% de identidad de secuencia o más). El término "identidad sustancial" significa que dos secuencias de polipéptido, cuando se alinean óptimamente, tales como mediante los programas GAP o BESTFIT que utilizan peso de espacio por defecto, comparten al menos 80-90% de la identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90-95% de la identidad de secuencia, y más preferiblemente al menos 95% de la identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99% de la identidad de secuencia o más). Para comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa

como una secuencia de referencia, a la cual las secuencias de ensayo se comparan. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencia, el ensayo y las secuencias de referencia son ingresadas a una computadora, y son diseñadas coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan parámetros de programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula entonces la identidad de secuencia porcentual para las secuencias de ensayo con relación a la secuencia de referencia con base en los parámetros de programa designados.

El alineamiento óptimo de las secuencias para comparación se pueden conducir por ejemplo mediante un algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda de un método de similaridad de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (*ver generalmente Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology*). Un ejemplo de algoritmo es adecuado para determinar la identidad de secuencia porcentual y la similaridad de secuencia en el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al., J. Mol. Biol.* 215:403 (1990). El Software para desarrollar los análisis BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (públicamente accesible a través de los servidores Internet de los Institutos Nacionales de Salud NCBI). Típicamente, los parámetros de programa por defecto se pueden utilizar para desarrollar la comparación de secuencia, aunque los parámetros de costumbre también se pueden utilizar. Para la secuencia de aminoácido, el programa BLASTP utiliza como defectos una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y una matriz de calificación BLOSUM62 (*ver Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

Preferiblemente, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren en las sustituciones de aminoácido conservadores. Para los propósitos de clasificar las sustituciones de aminoácidos como conservadoras o no conservadoras, los aminoácidos se agrupan como sigue: Grupo I (cadenas laterales hidrófobas): leu, met, ala, val, leu, ile; Grupo II (cadenas laterales hidrofílicas neutras): cys, ser, thr; Grupo III (cadenas laterales ácidas): asp, glu; Grupo IV (cadenas laterales básicas): asn, gln, his, lys, arg; Grupo V (residuos que influyen la orientación de cadena): gly, pro; y Grupo VI (cadenas laterales aromáticas): trp, tyr, phe. Las sustituciones conservadoras involucran sustituciones entre los aminoácidos en la misma clase. Las sustituciones no conservadoras constituyen intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra.

Preferiblemente, las inmunoglobulinas humanizadas o los antígenos de unión de anticuerpos con una afinidad que está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de aquella del anticuerpo no humanizado no correspondiente. Por ejemplo, si el anticuerpo no humanizado tiene una afinidad de unión de  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , los anticuerpos humanizados tendrán una afinidad de unión de al menos  $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ ,  $4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  o  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ . Cuando se describen las propiedades de unión de una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo, esta cadena se puede describir con base en su capacidad para "dirigir unión de antígeno (por ejemplo, A $\beta$ )". Se dice que una cadena "dirige la unión de antígeno" cuando esta le confiere luego de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión de antígeno de éste) una propiedad de unión específica o afinidad de unión. Una mutación (por ejemplo retromutación) se dice que afecta sustancialmente a la capacidad de la cadena pesada o ligera a dirigir la unión de antígeno si ésta afecta por ejemplo disminuye) la afinidad de unión de una inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmento de unión de anticuerpo de este) que comprende dicha cadena mediante al menos un orden de magnitud comparado con aquel del anticuerpo (o fragmento menor

de antígeno de éste) que comprende una cadena equivalente a la que le falta dicha mutación. Una mutación "no afecta sustancialmente (por ejemplo disminuye) la capacidad de una cadena a dirigir la unión de antígeno" si esta afecta (por ejemplo disminuye) la afinidad de unión de la inmunoglobulina o anticuerpo intacto (o fragmentos de unión de antígeno de éste) que comprende dicha cadena por solo un factor de dos, tres, o cuatro de aquel del anticuerpo (o fragmento de unión de antígeno de éste) que comprende una cadena equivalente a la que le falta dicha mutación.

El término "inmunoglobulina quimérica" o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables se derivan de unas primeras especies y cuyas regiones constantes se derivan de unas segundas especies. Las inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos se pueden construir, por ejemplo, mediante ingeniería genética, de segmentos de gen de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Los términos "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" no están destinados a comprender inmunoglobulinas o anticuerpos quiméricos, como se define infra. Aunque las inmunoglobulinas o anticuerpos humanizados son quiméricos en su construcción (es decir comprende regiones de más de una especie de proteínas), ellas incluyen características adicionales (es decir regiones variables que comprenden residuos CDR donadores y residuos de sutura aceptadora) no encontrados en las inmunoglobulinas o anticuerpo quiméricos, como se definió aquí.

Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en el arte, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en Robinson *et al.* Solicitud Internacional No. PCT/US86/02269; Akira, *et al.* Solicitud de Patente Europea 184,187; Taniguchi, M., Solicitud de Patente Europea 171,496; Morrison *et al.* Solicitud de Patente Europea 173,494; Neuberger *et*

*et al.* Publicación de Internacional PCT No. WO.86/01533; Cabilli *et al.* Patente U.S. No. 4,816,567; Cabilli *et al.* Solicitud de Patente Europea 125,023; Better *et al.* (1988) Science 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) Canc. Res. 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) Nature 314:446-449; y Shaw *et al.* (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559); Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) BioTechniques 4:214; Winter Patente U.S. 5,225,539; Jones *et al.* (1986) Nature 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) Science 239:1534; y Beidler *et al.* (1988) J. Immunol. 141:4053-4060.

### Los Anticuerpos Humanos Provenientes de Animales Transgénicos y de Despliegue de Fago

Alternativamente, es ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, luego de inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión de homocigoto del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo ( $J_H$ ) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal resulta en la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógena. La transferencia de la disposición del gen de inmunoglobulina de línea germinal de humano en tales ratones mutantes de línea germinal resulta de la producción de anticuerpos humanos luego de la disposición al antígeno. Ver, por ejemplo, Patente U.S. Nos. 6,150,584; 6,114,598; y 5,770,429.

Los anticuerpos completamente humanos también se derivan de la librerías de despliegue de fago (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)).

Anticuerpos Bioespecíficos, polipéptidos de fusión de anticuerpo y anticuerpo de cadena simple

Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos diferentes epítopos. Tales anticuerpos se pueden derivar de anticuerpos de longitud completa o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab)'<sub>2</sub>). Los métodos para elaborar los anticuerpos biespecíficos son conocidos en el arte. La producción tradicional de los anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al.*, Nature, 305:537-539 (1983)). En razón a la clasificación aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, éstos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diferentes moléculas de anticuerpo (ver, WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10:3655-3659 (1991)).

Los anticuerpos biespecíficos también incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina a biotina u otra carga neta. Los anticuerpos heteroconjugados se pueden hacer utilizando cualesquier métodos de reticulación convenientes. Los agentes reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica, y son descritos en la Patente U.S. No. 4,676,980, junto con un número de técnicas de reticulación.

En aún otra modalidad, el anticuerpo se puede fusionar, química o genéticamente, a un dominio de carga neta, tal como una porción reactiva, detectable, o funcional, por ejemplo, una inmunotoxina para producir un polipéptido de fusión de

anticuerpo. Tales cargas netas incluyen, por ejemplo, inmunotoxinas, quimioterapéuticos, y radioisótopos, todos los cuales son bien conocidos en la arte.

Los anticuerpos de cadena simple son también adecuados para la estabilización de acuerdo a la invención. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) con un ligador, que le permite a cada región variable hacer interfase una con la otra y recrear el bolsillo de unión de antígeno de un anticuerpo padre del cual se derivan las regiones VL y VH. Ver Gruber *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se entiende que cualquiera de las moléculas de polipéptido anteriores, sola o en combinación, son adecuadas para la preparación de formulaciones estabilizadas de acuerdo con la invención.

#### Polipéptidos de unión de antígeno terapéutico

Un número de los polipéptidos de unión de antígeno terapéutico son adecuados para ser formuladas de acuerdo con las condiciones de estabilización de la presente invención. Típicamente, los polipéptidos de unión de antígeno son anticuerpos o fragmentos de éstos (ver *supra*), que comprenden una región variable de anticuerpo y/o región Fc de anticuerpo o al menos una porción de una inmunoglobulina, proteínas de la superfamilia de inmunoglobulina, o receptor o dominio similar a receptor, que puede interactuar con un antígeno blanco o una molécula del sistema inmune, por ejemplo, un receptor Fc. Por conveniencia, los polipéptidos de unión de antígeno que se pueden beneficiar de los métodos y formulaciones de la presente invención se discuten adelante de acuerdo a su clase de antígeno blanco. Tales polipéptidos de unión de

antígeno representativos se unen a las clases de antígeno que incluyen, por ejemplo, antígenos cancerosos, antígenos autoinmunes, alérgenos, y patógenos.

#### Polipéptidos de Unión de Antígeno Terapéutico que se Unen a Antígenos de Cáncer

En ciertas modalidades, los polipéptidos de unión de antígeno sometidos a los métodos y composiciones de la presente invención se pueden unir bajo una molécula específica para células tumorales por ejemplo, un antígeno específico de tumor. Tales antígenos específicos de tumor incluyen, por ejemplo, el antígeno pemfigoide buloso 2, el antígeno mucin de próstata (PMA), el antígeno Thomsen-Friedenreich asociado a tumor, el antígeno específico de próstata (PSA), el antígeno epitelial luminal (LEA. 135) de carcinoma mama y el carcinoma de célula transicional de vejiga (TCC), el antígeno de suero asociado a cáncer (CASA) y el antígeno de cáncer 125 (CA 125), la glicoproteína epitelial 40 (EGP40), el antígeno de carcinoma de célula escamosa (SCC), la catepsina E, la tirosinasa en melanoma, el antígeno nuclear de célula (PCNA) de cavernomas cerebrales, el antígeno de cáncer de mama DF3/MUC1, el antígeno carcinoembrionario, el antígeno asociado a tumor CA 19-9, los antígenos del melanoma humano MTÉCNICA-I/Melan-A27-35 y gp100, y los epítomos de glicopéptido de pancarcinoma T y Tn (CA), un autoantígeno asociado a tumor de 35 kD en carcinoma de tiroides papilar, el antígeno de adenocarcinoma KH-1, el antígeno a micobacterial A60, las proteínas de choque de calor (HSP), los productos de oncogen mutante, por ejemplo, p53, ras, y HER-2/neu.

#### Los polipéptidos de unión de antígeno terapéuticos que se unen a Moléculas de Inflamación y la Enfermedad Autoinmune

En ciertas modalidades, los polipéptidos de unión de antígeno sometidos a los métodos y composiciones de la presente invención se pueden unir a una molécula responsable de la inflamación o trastorno autoinmune. Tales polipéptidos de unión de antígeno se pueden unir a moléculas asociadas con artritis reumatoide, SLE, diabetes melitus, miastenia gravis, artritis reactiva, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, IBD, psoriasis, pancreatitis, y varias inmunodeficiencias. Otros antígenos blancos incluyen 2-GPI, glicoproteína de 50 kDa, antígeno Ku (p70/p80), o su proteína de subunidad de 80-kd, los autoantígenos nucleares La (SS-B) y Ro (SS-A), antígenos de escleroderma Rpp 30, Rpp 38 o Scl-70, el antígeno de centrosoma PCM-1, el autoantígeno de polimiositis-escleroderma (PM-Scl), escleroderma (y otras enfermedad autoinmune sistémicas) el autoantígeno CENP-A, U5, una ribonucleoproteína nuclear pequeña (snRNP), la proteína de 100-kd del autoantígeno PM-Scl, las ribonucleoproteínas U3- y Th(7-2) nucleolares, la proteína ribosomal L7, la proteína de 36-kd proveniente del antígeno de matriz nuclear, insulina, proinsulina, GAD65 y GAD67, proteína de choque de calor 65 (hsp65), y el antígeno de célula islote 69 (ICA69), la proteína tirosina fosfatasa relacionada con antígeno de célula islote (PTP), el gangliosido GM2-1, la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD), el antígeno de célula islote (ICA69), Tep69, el epitopo de célula T simple reconocido por las células T de pacientes diabéticos, ICA 512, un antígeno de diabetes tipo I, una tirosina fosfatasa de proteína de célula islote y el antígeno de 37-kDa derivado de éste en la diabetes tipo 1 (que incluye IA-2, IA-2), la proteína de 64 kDa de las células In-111 de células foliculares de tiroides humana que se inmunoprecipita con suero de pacientes con anticuerpos de superficie de célula islote (ICSA). En particular, los antígenos de artritis reumatoide incluyen un antígeno nuclear 45 kDa DEK, en particular artritis reumatoide de ataque juvenil e iridociclitis, glicoproteína-39 de cartilago humano, y autoantígeno en artritis reumatoide, un antígeno de 68 k en artritis reumatoide, colágeno, colágeno tipo II, proteína de enlace de cartilago, ezrina, radixina y moesina, proteína de choque de calor micobacterial 65, peroxidasa de tiroides y el receptor de hormona estimulante de

tiroides, la peroxidasa de tiroides proveniente de la enfermedad de tiroides de Grave, un antígeno de 64-kDa asociado con la oftalmopatía asociada a tiroides, el receptor de TSH humano, y la proteína de 64 kDa de las células In-111 o las células foliculares de tiroides humana que se inmunoprecipitan con los sueros de los pacientes con los anticuerpos de superficie de célula islote.

#### Los Polipéptidos de Unión de Antígeno Terapéuticos que se Unen a Alérgenos

En ciertas modalidades, los polipéptidos que se unen a antígeno someten sujetos a los métodos y composiciones de la presente invención se pueden unir a un alérgeno o molécula responsable de una enfermedad o afección alérgica. Tales polipéptidos de unión de antígeno se pueden unir a IgE, los receptores IgE, receptor de célula T (TCR), citoquinas, o alérgenos, por ejemplo, de los ácaros de polvo casero, el polen de pasto, el polen de abedul, el polen de altamiza, el polen de avellano, cucaracha, arroz, el polen de árbol de oliva, hongos, mostaza, veneno de abejas, alérgenos a animales, por ejemplo, provenientes de caballo, perro o gato, y similares. Los alérgenos también incluyen alérgenos de látex.

#### Los Polipéptidos de Unión de Antígeno Terapéuticos que se unen a Patógenos y a Toxinas Asociadas

En ciertas modalidades, los polipéptidos de unión de antígeno sometidos a los métodos y composiciones de la presente invención se pueden unir a un patógeno, por ejemplo, un patógeno bacterial, fúngico, o vírico, o, por ejemplo, una toxina de éstos. Tales polipéptidos de unión de antígeno se unen a patógenos (o toxinas de éstos) que incluyen Yersinia, por ejemplo, Yersinia pestis, el agente causante de la plaga, en particular el antígeno V, Bacillus anthracis, el agente causante del ántrax, en particular, el

antígeno protector ántrax (PA) o factor letal (LF), *Staphylococcus*, por ejemplo, *S. aureus* y *S. epidermidis*, y *Streptococcus* y/o sus toxinas asociadas, *E. coli*, por ejemplo, la sepa O-157:H7 que origina la enfermedad de origen en alimentos; la bacteria del Cólera, por ejemplo, el *Vibrio colera*, o la enterotoxina de este; el *Helicobacter pilori*, por ejemplo, los antígenos CagA y VacA; la *Clamidia*; la *Neisseria gonorrhoeae*; y *Meisseria meningitidis*; la *Bordetella pertussis*; la *Brucella abortus*; los antígenos meningocócicos; los antígenos de pneumococo; los monocitógenos de listeria; la *Salmonela*; la *Shigella* y el *Micobacterio* en tuberculosis; los patógenos vírico, por ejemplo, el virus del Hanta, las flavivirus, la influenza; el VIH, por ejemplo, los antígenos Gag, Pol, Vif y Nef; los rotavirus; el virus del herpes simplex tipo I/II; la Hepatitis A, B, C; o G; rabias; el papilomavirus; el virus de Epstein-Barr (EBV); sarampión; CMV; y parásitos.

#### Anticuerpos Anti A $\beta$

Generalmente, las formulaciones de la presente invención incluyen una variedad de anticuerpos para tratar las enfermedades amiloidogénicas, en particular, la Enfermedad de Alzheimer, mediante péptido A $\beta$  blanco.

Los términos “anticuerpo A $\beta$ ”, “anticuerpo anti A $\beta$ ” y “anti A $\beta$ ” se utilizan intercambiabilmente aquí para referirse a un anticuerpo que se une a uno o más epítomos o determinantes antigénicos de la proteína precursora amiloide humana (APP), la proteína A $\beta$ , o ambas. Los epítomos de ejemplos o los determinantes antigénicos se pueden encontrar dentro del APP, pero son preferiblemente encontrados dentro del péptido A $\beta$  del APP. Las isoformas múltiples del APP existen, por ejemplo el APP<sup>695</sup>, el APP<sup>751</sup> y el APP<sup>770</sup>. Los aminoácidos dentro del APP son asignados a números de acuerdo a la secuencia de la isoforma APP<sup>770</sup> (ver *por ejemplo*, GenBank No. de Acceso P05067). Ejemplos de isotipos específicos de APP que son habitualmente

conocidos por existir en los humanos son el polipéptido de aminoácido 695 descrito por Kang *et al.* (1987) *Nature* 325:733-736 que se designa como el APP "normal"; el polipéptido del aminoácido 751 descrito por Ponte *et al.* (1988) *Nature* 331:525-527 (1988) y Tanzi *et al.* (1988) *Nature* 331:528-530; y el polipéptido de aminoácido 770 descrito por Kitaguchi *et al.* (1988) *Nature* 331:530-532. Como resultado de procesamiento proteolítico de APP por diferentes enzimas de secretasa *in vivo* o *in situ*, el A $\beta$  se encuentra tanto en la "forma corta", 40 aminoácidos de longitud, como en la "forma larga", que varían desde 42-43 aminoácidos de longitud. La forma corta, A $\beta$ <sub>40</sub>, consiste de los residuos 672-711 de APP. La forma larga, por ejemplo, A $\beta$ <sub>42</sub> o A $\beta$ <sub>43</sub>, consiste de los residuos 672-713 o 672-714, respectivamente. Parte de dominio hidrófobo del APP se encuentra en el extremo carboxi del A $\beta$ , y puede contar para la capacidad del A $\beta$ , a agregarse. Particularmente en el caso de la forma larga. El péptido A $\beta$  se puede encontrar en, o purificado de, los fluidos del cuerpo de humanos y otros mamíferos, por ejemplo el fluido cerebroespinal, que incluyen tanto los individuos normales como los individuos que sufren de trastornos amiloidogénicos.

Los términos "proteína  $\beta$ -amiloide", "péptido  $\beta$ -amiloide", " $\beta$ -amiloide", "A $\beta$ " y "péptido A $\beta$ " se utilizan intercambiabilmente aquí. El péptido A $\beta$  (por ejemplo, el A $\beta$ <sub>39</sub>, A $\beta$ <sub>40</sub>, A $\beta$ <sub>41</sub>, A $\beta$ <sub>42</sub> y A $\beta$ <sub>43</sub>) es un fragmento interno de 4-kDa de 39-43 aminoácidos de APP. El A $\beta$ <sub>40</sub>, por ejemplo, consiste de los residuos 672-711 del APP y el A $\beta$ <sub>42</sub> consiste de los residuos 672-713 del APP. Los péptidos A $\beta$  incluyen los péptidos que resultan del clivaje de secretasa del APP y los péptidos sintéticos que tienen la misma o esencialmente la misma secuencia que los productos de clivaje. Los péptidos A $\beta$  se pueden derivar de una variedad de fuentes, por ejemplo, tejidos, líneas celulares, o fluidos de cuerpo (por ejemplo suero o fluido cerebroespinal). Por ejemplo, un A $\beta$  se puede derivar de células que expresan APP tales como las células de ovario de hámster Chino (CHO) establemente transfectadas con APP<sub>717V→F</sub>, como se describió,

por ejemplo, en Walsh *et al.*, (2002), *Nature*, 416, pp 535-539. Una preparación A $\beta$  se puede derivar de fuentes de tejido que utiliza los métodos previamente descritos (ver, por ejemplo, Johnson-Wood *et al.*, (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1550). Alternativamente, los péptidos A $\beta$  se pueden sintetizar utilizando métodos que son bien conocidos en el arte. Ver, por ejemplo, Fields *et al.*, *Synthetic Péptidos: A User's Guide*, ed. Grant, W.H. Freeman & Co., New York, NY, 1992, p 77). De esta manera, los péptidos se pueden sintetizar utilizando unas técnicas Merrifield automatizadas de síntesis de fase sólida con el grupo  $\alpha$ -amino protegido por la química t-Boc o F-moc utilizando aminoácidos protegidos de cadena lateral sobre, por ejemplo, un Sintetizador de Péptido de Applied Biosystems Modelo 430A o 431. Los antígenos de péptido más largo se pueden sintetizar utilizan las técnicas de ADN recombinantes-conocidas. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica el péptido o el péptido de fusión se puede sintetizar o clonar molecularmente e insertar en un vector de expresión adecuado para la transfección y la expresión heteróloga mediante una célula huésped adecuada. El péptido A $\beta$  también se refiere a las secuencias A $\beta$  que resultan de las mutaciones en la región A $\beta$  del gen normal.

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio o a un antígeno al cual una inmunoglobulina o anticuerpo (o fragmento de unión de antígeno de éste) se une específicamente. Los epitopos de ejemplo o los determinantes antigénicos a los cuales un anticuerpo A $\beta$  se une se pueden encontrar dentro de la proteína precursora amiloide humana (APP), pero se encuentran preferiblemente dentro del péptido A $\beta$  del APP. Los epitopos de ejemplo o determinantes antigénicos dentro del A $\beta$  se localizan dentro del N-terminal, la región central, o el terminal C del A $\beta$ . Un "epítipo N-terminal", es un epítipo o determinante antigénico localizado dentro del terminal N del péptido A $\beta$ . Los epítipos N-terminales de ejemplo incluyen residuos dentro de los aminoácidos 1-10 o 1-12 del A $\beta$ , preferiblemente de los residuos 1-3, 1-4,

1-5, 1-6, 1-7, 2-6, 2-7, 3-6, o 3-7 del A $\beta$ 42. Otros epítomos N-terminales de ejemplo inician en los residuos 1-3 y en los extremos en los residuos 7-11 de A $\beta$ . Ejemplos adicionales de epítomos N-terminales incluyen los residuos 2-4, 5, 6, 7 o 8 de A $\beta$ , los residuos 3-5, 6, 7, 8 o 9 de A $\beta$ , o los residuos 4-7, 8, 9 o 10 de A $\beta$ 42. Los epítomos “centrales” son epítomos o determinantes antigénicos que comprenden los residuos localizados dentro de la porción central o media del péptido A $\beta$ . Los epítomos centrales de ejemplo incluyen residuos dentro de los aminoácidos 13-28 de A $\beta$ , preferiblemente de los residuos 14-27, 15-26, 16-25, 17-24, 18-23, o 19-22 de A $\beta$ . Otro epítomos centrales de ejemplo incluyen los residuos dentro de los aminoácidos 16-24, 16-23, 16-22, 16-21, 18-21, 19-21, 19-22, 19-23, o 19-24 de A $\beta$ . Los epítomos “C-terminales” o los determinantes antigénicos se localizan dentro del terminal C del péptido A $\beta$  e incluyen los residuos dentro de los aminoácidos 33-40, 33-41, o 33-42 de A $\beta$ . Los epítomos C-terminales adicionales de ejemplo o los determinantes antigénicos incluyen los residuos 33-40 del A $\beta$ .

Cuando se dice que un anticuerpo se une a un epítomo dentro de los residuos especificados, tales como el A $\beta$  3-7, lo que se significa que el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que contiene los residuos específicos (es decir, A $\beta$  3-7 en este ejemplo). Tal anticuerpo no contacta necesariamente cada residuo dentro del A $\beta$  3-7. Ni cada sustitución o supresión de aminoácido simple dentro del A $\beta$  3-7 necesariamente afecta significativamente la afinidad de unión. En varias modalidades, un anticuerpo A $\beta$  es específico de extremo. Como se utiliza aquí, el término “específico de extremo” se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a los residuos N-terminales o C-terminales de un péptido A $\beta$  pero que no reconocen los mismos residuos cuando se presentan en las especies A $\beta$  más largas que comprenden los residuos o en el APP. En varias modalidades, un anticuerpo A $\beta$  es “específico del terminal C”. Como se utiliza aquí, el término “específico de terminal C” significa que el anticuerpo reconoce

específicamente el terminal C libre de un péptido A $\beta$ . Los ejemplos de los anticuerpos A $\beta$  específicos de terminal C incluyen aquellos que: reconocen un péptido A $\beta$  que termina en un residuo 40 pero que no reconoce un péptido A $\beta$  que termina en el residuo 41, 42, y/o 43; reconoce un péptido A $\beta$  que termina en el residuo 42 pero no reconoce un péptido A $\beta$  que termina en el residuo 40, 41, y/o 43; etc.

En una modalidad, el anticuerpo A $\beta$  puede ser un anticuerpo 3D6 o una variante de este, o un anticuerpo 10D5 o una variante de este, ambos los cuales se describen en la Publicación de Patente U.S. No. 20030165496A1, Publicación de Patente U.S. No. 20040087777A1, Publicación de Patente Internacional No. WO02/46237A3 y Publicación de Patente Internacional No. WO04/080419A2. La descripción de los anticuerpos 3D6 y 10D5 también se puede encontrar, por ejemplo, en la Publicación de Patente Internacional No. WO02/088306A2 y Publicación de Patente Internacional No. WO02/088307A2. Los anticuerpos 3D6 adicionales se describen en la Solicitud de Patente U.S. No. 11/303,478 y la Solicitud Internacional No. PCT/US05/45614. El 3D6 es un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une específicamente a un epítipo N-terminal localizado en el péptido  $\beta$ -amiloide humano, específicamente, los residuos 1-5. Por comparación, el 10D5 es el mAb que se une específicamente a un epítipo N-terminal localizado en el péptido  $\beta$ -amiloide humano, específicamente, los residuos 3-6. En una modalidad, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 12B4 o una variante de este, como se describió en la Publicación de Patente U.S. No. 20040082762A1 y Publicación de Patente Internacional No. WO03/077858A2. El 12B4 es un mAb que se une específicamente a un epítipo N-terminal localizado en el péptido  $\beta$ -amiloide, específicamente, los residuos 3-7. En aún una modalidad, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 12A11 o una variante de este, como se describió en la Publicación de Patente U.S. No. 20050118651A1 y Publicación de Patente Internacional No. WO04/10885A2. El 12A11 es un mAb que se une específicamente a un epítipo N-terminal localizado en el péptido  $\beta$ -amiloide humano, específicamente, los residuos 3-7.

En aún una modalidad, el anticuerpo pueden ser un anticuerpo 15C11 o una variante de este, como se describió en la Solicitud de Patente U.S. No. 11/304,986 y la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US05/45515 titulada "Humanized Antibodies that Recognize Beta Amiloid Peptide." El 15C11 es un mAb que se une específicamente a un epítipo central localizado en el péptido  $\beta$ -amiloide, específicamente, los residuos 19-22. En aún otra modalidad, el anticuerpo puede ser un anticuerpo 266 como se describió en la Publicación de Patente U.S. No. 20050249725A1, y la Publicación de Patente Internacional No. WO01/62801A2. Los anticuerpos designados para unirse específicamente a los epítopos C-terminales en el péptido  $\beta$ -amiloide humano, para uso en la presente invención incluyen, pero no están limitados a, 369.2B, como se describió en la Patente U.S. No. 5,786,160.

Los anticuerpos para uso en la presente invención se pueden producir recombinante o sintéticamente. Por ejemplo, el anticuerpo se puede producir mediante un proceso de cultivo de células de ovario de hámster Chino recombinantes (CHO). Además, los anticuerpos con modificaciones menores que retienen la propiedad funcional primaria de la unión del péptido  $A\beta$  se contempla por medio de la presente invención. En una modalidad particular, el anticuerpo es un anticuerpo 3D6 de péptido anti  $A\beta$  humanizado que se une selectivamente al péptido  $A\beta$ . Más específicamente, el anticuerpo 3D6 de péptido anti  $A\beta$  humanizado se designa para unirse específicamente al epítipo terminal NH2 localizado en el péptido 1-40 o 1-42  $\beta$ -amiloide humano encontrado en los depósitos de placa en el cerebro (por ejemplo, en pacientes que sufren de enfermedad de Alzheimer).

La Figura 1 suministra una representación esquemática de la estructura predicha de un anticuerpo 3D6 de péptido  $A\beta$  humanizado de ejemplo denominado h3D6v2. Las secuencias de los aminoácidos completos de las cadenas ligera y pesada h3D6v2

predichas de las secuencias de ADN de los correspondientes vectores de expresión se muestran en la Figura 2 (donde los residuos son numerados partiendo con el terminal NH<sub>2</sub> de las cadenas ligera y pesada como el número de residuo 1). El último residuo de aminoácido codificado por la secuencia de ADN de cadena pesada, Lis<sup>449</sup>, no ha sido observado en la forma secretada madura del h3D6v2 y, sin querer estar ligado por ninguna teoría particular, este presumiblemente se remueve durante el procesamiento intracelular mediante las proteasas celulares CHO. Por lo tanto, el terminal COOH de la cadena pesada h3D6v2 es opcionalmente Gli<sup>448</sup>. El procesamiento de la lisina terminal COOH ha sido observado en anticuerpos recombinantes y derivados de plasma y no parece impactar su función (Harris (1995) *J. Chromatogr. A.* 705:129-134). El h3D6v2 es post-traduccionalmente modificado mediante la adición de glicanos N-ligados a la porción Fc de la cadena pesada, que es conocida por contener un sitio de consenso de N-glicosilación. El sitio de N-glicosilación despliega tres complejos principales de estructuras de oligosacárido neutras biantenarias comúnmente observadas por el sitio de N-glicosilación análogo de las proteínas IgG de mamífero.

Otro anticuerpo de péptido anti A $\beta$  humanizado de ejemplo es la versión 1 3D6 humanizada (hu3D6v1) que tiene la secuencia establecida en la Figura 2 pero para sustitución D→Y en la posición 1 de la cadena ligera.

En varias modalidades de la presente invención, el anticuerpo anti A $\beta$  (por ejemplo, un anticuerpo 3D6 de péptido anti A $\beta$  humanizado) está presente desde aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, desde aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, desde aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, desde aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml, desde aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml, desde aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, desde aproximadamente 10

mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, desde aproximadamente 20 mg/ml a 30 mg/ml, o mayor, por ejemplo, hasta aproximadamente 100 mg/ml, a aproximadamente 200 mg/ml, a aproximadamente 500 mg/ml, o a aproximadamente 1000 mg/ml o más. En varias modalidades, el anticuerpo anti A $\beta$  está presente en aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 mg/ml. En una modalidad particular, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo 3D6 de péptido anti A $\beta$  humanizado) está presente en aproximadamente 17 mg/ml. En una modalidad particular, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo 3D6 de péptido anti A $\beta$  humanizado) está presente en aproximadamente 20 mg/ml. En una modalidad particular, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo 3D6 de péptido anti A $\beta$  humanizado) en aproximadamente 30 mg/ml. Los rangos intermedios a las concentraciones anteriormente citadas, por ejemplo, aproximadamente 12 mg/ml a aproximadamente 17 mg/ml, también pretenden ser parte de esta invención. Por ejemplo, los rangos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores citados anteriores como límites superiores y/o inferiores pretenden estar incluidos.

### Excipientes

En varias modalidades, la presente invención suministra una formulación que puede incluir varios excipientes, que incluyen, pero no está limitada a, amortiguador, antioxidante, un agente de tonicidad, y un estabilizador. Además, las formulaciones pueden contener un agente para ajuste de pH (por ejemplo, HCl) y un diluyente (por ejemplo, agua). En parte, los excipientes sirven para, en parte, mantener la estabilidad y la actividad biológica del anticuerpo (por ejemplo, al mantener la conformación adecuada de la proteína), y/o mantener el pH.

### Agente Amortiguante

En varios aspectos de la presente invención, la formulación incluye un agente amortiguante (amortiguador). El amortiguador puede servir para mejorar la isotonicidad y estabilidad química de la formulación. Además, el amortiguador sirve para mantener el pH fisiológicamente adecuado (*por ejemplo*, un pH de aproximadamente 6.0). En general, la formulación debe tener un pH fisiológicamente adecuado. En varias modalidades de la presente invención, la formulación debe tener un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7 o desde aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.5. En una modalidad particular, la formulación tiene un pH de aproximadamente 6. Los rangos intermedios a los niveles de pH citados anteriormente, *por ejemplo*, aproximadamente pH 5.2 a aproximadamente pH 6.3 (*por ejemplo*, pH 6.2), también pretenden ser parte de esta invención. Por ejemplo, los rangos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente citados como límite superior y/o inferior pretenden estar incluidos. El pH se puede ajustar según sea necesario mediante las técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, se puede agregar HCl según sea necesario para ajustar el pH a los niveles deseados o a diferentes formas de histidina se pueden agregar según sea necesario para ajustar el pH en los niveles deseados.

El amortiguador puede incluir, pero no está limitado a, succinato (sodio o fosfato), histidina, fosfato (sodio o potasio), Tris (tris (hidroximetil) aminometano), dietanolamina, citrato, otros ácidos orgánicos y mezclas de éstos. En una modalidad particular, el amortiguador es histidina (*por ejemplo*, L-histidina). En otra modalidad particular, el amortiguador es succinato. En otra modalidad, la formulación incluye un aminoácido tal como histidina que está presente en una cantidad suficiente para mantener la formulación en un pH fisiológicamente adecuado. La histidina es un aminoácido de ejemplo que tiene las capacidades de amortiguamiento en el rango de pH fisiológico. La histidina deriva su capacidad de amortiguamiento de su grupo imidazol. En una

modalidad de ejemplo, el amortiguador es L-histidina (base) (*por ejemplo*  $C_6H_9N_3O_2$ , FW: 155.15). En otra modalidad, el amortiguador es monohidrato de monoclóruo de L-histidina (*por ejemplo*  $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$ , FW: 209.63). En otra modalidad de ejemplo, el amortiguador es una mezcla de L-histidina (base) y Monohidrato de monoclóruo de L-histidina.

En una modalidad, el amortiguador (por ejemplo, L-histidina o succinato) está presente desde aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 50 mM, desde aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 40 mM, desde aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 25 mM, desde aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 30 mM, desde aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 20 mM, o desde aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, preferiblemente aproximadamente 5 mM o 10 mM. En varias modalidades, el amortiguador puede estar presente en aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, o 15 mM. En una modalidad particular, el amortiguador está presente en aproximadamente 10 mM. Los rangos intermedios a las concentraciones anteriormente citadas, por ejemplo, aproximadamente 12 mM a aproximadamente 17 mM, también pretenden ser parte de esta invención. Por ejemplo, los rangos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente citados como límites superior y/o inferior pretenden estar incluidos. En ciertas modalidades, el amortiguador está presente en una cantidad suficiente para mantener el pH fisiológicamente adecuado.

#### Agente de Tonicidad

En varios aspectos de la presente invención, la formulación incluye un agente de tonicidad. En parte, el agente de tonicidad contribuye a mantener la isotonicidad de la

formulación, y a mantener niveles de proteína. En parte, el agente de tonicidad contribuye a preservar el nivel, tasa, o proporción del polipéptido terapéuticamente activo presente en la formulación. Como se utiliza aquí, el término "tonicidad" se refiere al comportamiento de los componentes biológicos en un ambiente solución de fluido. Las soluciones isotónicas poseen la misma presión osmótica que el plasma de la sangre, y así se pueden infundir intravenosamente a un sujeto sin cambiar la presión osmótica del plasma de la sangre del sujeto. De hecho, en una modalidad de acuerdo con la invención, el agente de tonicidad está presente en una cantidad suficiente para hacer la formulación adecuada para infusión intravenosa. A menudo, el agente de tonicidad sirve como un agente de masa también. Como tal, el agente puede permitirle a la proteína solucionar varias tensiones tales como el congelamiento y el corte.

El agente de tonicidad puede incluir, pero no está limitado a,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ , lactosa, sorbitol, sucrosa, manitol, trehalosa, rafinosa, polietilenglicol, hidroxietil almidón, glicina y mezclas de éstos. En una modalidad particular, el agente de tonicidad es manitol (por ejemplo, D-manitol, por ejemplo,  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ , FW: 182.17).

En una modalidad, el agente de tonicidad (por ejemplo, manitol) está presente en aproximadamente 2% a aproximadamente 6% p/v, o aproximadamente 3% a aproximadamente 5% p/v. En otra modalidad, el agente de tonicidad está presente en aproximadamente 3.5% a aproximadamente 4.5% p/v. En otra modalidad, el agente de tonicidad es porcentual a aproximadamente 20mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml, a aproximadamente 30 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, o aproximadamente 35 mg/ml a aproximadamente 45 mg/ml. En una modalidad particular, el agente de tonicidad está presente en aproximadamente 4% p/v o en aproximadamente 40 mg/ml. En otra modalidad particular, el agente de tonicidad está presente en aproximadamente

6% p/v. En aún otra modalidad particular, el agente de tonicidad está presente en aproximadamente 10% p/v.

Los rangos intermedios a las concentraciones anteriormente citadas, por ejemplo, aproximadamente 3.2% a aproximadamente 4.3% p/v o aproximadamente 32 a aproximadamente 43 mg/ml, también pretenden ser parte de esta invención. Por ejemplo, los rangos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores citados anteriormente como límites superior y/o inferior pretenden estar incluidos. El agente de tonicidad debe estar presente en una cantidad suficiente con el fin de mantener la tonicidad de la formulación.

#### Antioxidante

En varios aspectos de la presente invención, la formulación incluye un antioxidante para, en parte, preservar la formulación (por ejemplo, al prevenir la oxidación).

El antioxidante puede incluir, pero no está limitado a, GLA (ácido gamma-linolénico)-ácido lipóico, DHA (ácido docosahexaenóico)-ácido lipóico, GLA-tocoferol, di-GLA-ácido 3,3'-tiodipropiónico y en general cualquiera de, por ejemplo, GLA, DGLA (ácido dihomogamma-linolénico), AA (ácido araquidónico), SA (ácido salicílico), EPA (ácido eicosapentaenóico) o DHA (ácido docosahexaenóico) con cualquier antioxidante natural o sintético con el cual ellos puedan estar químicamente ligados. Estos incluyen antioxidantes fenólicos (por ejemplo, eugenol, ácido carnósico, ácido caféico, BHT (hidroxianisol butilado), ácido gálico, tocoferoles, tocotrienoles y antioxidantes flavenóides (tales como miricetina y fisetina)), polienos (por ejemplo, ácido retinóico), esteroides insaturados (por ejemplo,  $\Delta^5$ -avenosterol), compuestos de organosulfuro (por

ejemplo, alicina), terpenos (por ejemplo, geraniol, ácido abiético) y antioxidantes de aminoácido (por ejemplo, metionina, cisteína, carnosina). En una modalidad, el antioxidante es ácido ascórbico. En una modalidad particular, el antioxidante es metionina, o un análogo de este, por ejemplo, selenometionina, ácido hidroximetilbutanéico, etionina, o trifluorometionina.

En una modalidad, el antioxidante (por ejemplo, una metionina tal como L-metionina, por ejemplo  $\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ , FW=149.21) está presente desde aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 50 mM, desde aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 40 mM, desde aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 30 mM, desde aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 20 mM, o desde aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM. En varias modalidades, el antioxidante puede estar presente en aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, o 15 mM. En una modalidad particular, el antioxidante está presente en aproximadamente 10 mM. En una modalidad particular, el antioxidante está presente en aproximadamente 15 mM. Los rangos intermedios a las concentraciones anteriormente citadas, por ejemplo, a aproximadamente 12 mM a aproximadamente 17 mM, también pretenden ser parte de esta invención. Por ejemplo, los rangos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores anteriores citados como límites superior y/o inferior pretenden estar incluidos. En ciertas modalidades, el antioxidante debe estar presente en una cantidad suficiente con fin de preservar la formulación, en parte, al prevenir la oxidación.

### Estabilizador

En varios aspectos de la presente invención, la formulación incluye un estabilizador, también conocido como tensoactivo. Los estabilizadores son compuestos

químicos específicos que interactúan y estabilizan las moléculas biológicas y/o los excipientes farmacéuticos generales en una formulación. En ciertas modalidades, los estabilizadores se pueden utilizar en conjunto con un almacenamiento a temperatura inferior. Los estabilizadores generalmente protegen la proteína de la tensión inducida por la interfaz aire/solución y la tensión inducida por solución/superficie, que a menudo resulta en agregación de la proteína.

El estabilizador puede incluir, pero no está limitado a, glicerina, polisorbatos tales como polisorbato 80, ácidos dicarboxílicos, ácido oxálico, ácido succínico, ácido adípico, ácido fumárico, ácidos ftálicos, y combinaciones de éstos. En una modalidad particular, el estabilizador es polisorbato 80.

En una modalidad, el estabilizador (por ejemplo, polisorbato 80) está presente entre aproximadamente 0.001% p/v a aproximadamente 0.01% p/v, entre aproximadamente 0.001% p/v a aproximadamente 0.009% p/v, o entre aproximadamente 0.003% p/v a aproximadamente 0.007% p/v. En una modalidad particular, el estabilizador está presente en aproximadamente .005% p/v de la formulación. En una modalidad particular, el estabilizador está presente en aproximadamente 0.01% p/v. Los rangos intermedios a las concentraciones anteriormente citadas, por ejemplo, aproximadamente 0.002% p/v a aproximadamente 0.006% p/v, también pretenden ser parte de esta invención. Por ejemplo, los rangos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente citados como límites superior y/o inferior pretenden estar incluidos. El estabilizador debe estar presente en una cantidad suficiente como para estabilizar el polipéptido de unión A $\beta$  (por ejemplo, anticuerpo anti A $\beta$ ).

Otros vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizadores tales como aquellos descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) pueden estar incluidos en la formulación siempre y cuando ellos no afecten adversamente las características deseadas de la formulación. En una modalidad particular, la formulación está sustancialmente libre de preservativos, aunque, en modalidades alternativas, los preservativos se pueden agregar según sea necesario. Por ejemplo, los crioprotectores o lioprotectores pueden estar incluidos, por ejemplo, si la formulación es liofilizada.

En varios aspectos de la presente invención, las formulaciones opcionalmente incluyen algunas o todas las clases de excipientes descritos anteriormente. En un aspecto, las formulaciones de la presente invención incluyen un polipéptido de unión de antígeno (por ejemplo, anticuerpo anti  $A\beta$ , manitol e histidina. En modalidades particulares, las formulaciones pueden incluir un antioxidante tal como metionina, y/o un estabilizador tal como polisorbato 80. En ciertas modalidades, las formulaciones tienen un pH de aproximadamente 6. En otro aspecto, la formulación incluye un polipéptido de unión de antígeno (por ejemplo, un anticuerpo anti  $A\beta$ ), manitol, histidina y metionina. En aún otro aspecto, la formulación incluye un polipéptido de unión  $A\beta$  (por ejemplo, un anticuerpo anti  $A\beta$ ), manitol, histidina, metionina y polisorbato 80. En un aspecto particular de la invención, la formulación incluye aproximadamente 20 mg/ml un polipéptido de unión  $A\beta$  (por ejemplo, un anticuerpo anti  $A\beta$ ), 10 mM de histidina, 10 mM de metionina, 4% de manitol y tiene un pH de aproximadamente 6. En otro aspecto de la invención, la formulación incluye aproximadamente 20 mg/ml de polipéptido de unión  $A\beta$  (por ejemplo, anticuerpo anti  $A\beta$ ), 10 mM de histidina, 10 mM de metionina, 4% p/v de manitol, 0.01% p/v de polisorbato 80 y tien un pH de aproximadamente 6. En otro aspecto de la invención, la formulación incluye aproximadamente 20 mg/ml de polipéptido de unión  $A\beta$  (por ejemplo, anticuerpo anti  $A\beta$ ), 10 mM de histidina, 10 de

mM metionina, 4% p/v de manitol, 0.005% p/v de polisorbato 80 y tiene un pH de aproximadamente 6.

Las modalidades de ejemplos de la presente invención suministran preparaciones concentradas de un polipéptido de unión de antígeno (por ejemplo, anticuerpo anti  $A\beta$ ), a menudo útil como un producto de droga en masa. Adicionalmente, las modalidades de ejemplo de la presente invención son estables al congelamiento, liofilización y/o reconstitución. Más aún, las modalidades de ejemplo de la presente invención son estables durante periodos prolongados de tiempo. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención son estables durante al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 meses. En modalidades particulares, las formulaciones de la presente invención son estables durante al menos aproximadamente 12 meses, durante al menos aproximadamente 18 meses, durante al menos aproximadamente 24 meses, o durante al menos aproximadamente 30 meses.

De acuerdo con la invención, la formulación se puede almacenar a temperaturas desde aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $40^{\circ}\text{C}$ , desde aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$ , desde aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $15^{\circ}\text{C}$ , o desde aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $10^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente desde aproximadamente  $2^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $8^{\circ}\text{C}$ . En varias modalidades, la formulación se puede almacenar en aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$ ,  $1^{\circ}\text{C}$ ,  $2^{\circ}\text{C}$ ,  $3^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $6^{\circ}\text{C}$ ,  $7^{\circ}\text{C}$ ,  $8^{\circ}\text{C}$ ,  $9^{\circ}\text{C}$  o  $10^{\circ}\text{C}$ . En una modalidad particular, la formulación se almacena a aproximadamente  $5^{\circ}\text{C}$ . En general, la formulación es estable y retiene la actividad biológica en éstos rangos. Los rangos intermedios a las temperaturas citadas anteriormente, por ejemplo, desde aproximadamente  $2^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $17^{\circ}\text{C}$ , también pretenden ser parte de esta invención. Por ejemplo, los rangos de valores que

utilizan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente citados como límites superior y/o inferior pretenden estar incluidos.

Las formulaciones de la presente invención son adecuadas para el suministro mediante una variedad de técnicas. En ciertas modalidades, la formulación se administra parenteralmente, tal como intravenosamente o intramuscularmente. Adicionalmente, uno puede apuntar al suministro de la formulación al cerebro (por ejemplo, de tal forma que el anticuerpo pueda cruzar la barrera sangre cerebro) o el fluido de la columna. En una modalidad particular, la formulación se administra intravenosamente.

Las dosis efectivas de las formulaciones de la presente invención varían dependiendo de muchos diferentes factores, que incluyen medios para administración, sitio blanco, estado fisiológico del paciente, sea el paciente humano o animal, otras medicaciones administradas, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Usualmente, el paciente es un humano pero un mamífero no humano que incluye mamíferos transgénicos también se puede tratar. Las dosis de tratamiento necesitan ser tituladas para optimizar la seguridad y eficacia.

Para inmunización pasiva con un anticuerpo, los rangos de dosis de ejemplo desde aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y más usualmente desde aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0.15 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 0.5 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, preferiblemente aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg de peso del cuerpo del huésped. Por ejemplo las dosis pueden ser 1 mg/kg de peso de cuerpo o 20 mg/kg de peso de cuerpo o dentro del rango de 1-20 mg/kg, preferiblemente aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg,

aproximadamente 10 mg/kg, o aproximadamente 15 mg/kg. En otras modalidades de ejemplos, las dosis pueden ser al menos 0.5 mg/kg (por ejemplo 0.5, 0.6, 0.7, 0.75, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.25, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.75, 1.8, 1.9, o 2.0 mg/kg), al menos 0.75 mg/kg, al menos 1.25 mg/kg, al menos 1.5mg/kg, al menos 1.75 mg/kg, o al menos 2 mg/kg. A los sujetos les pueden administrar tales dosis diariamente, o alternativamente diariamente, semanalmente de acuerdo a cualquier otra programación determinada por análisis empírico. Un tratamiento de ejemplo indica la administración de múltiples dosis durante un periodo prolongado, por ejemplo, de al menos seis meses. Las regiones de tratamiento de ejemplo adicionales indican administración una vez cada dos semanas o una vez al mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los programas de dosis de ejemplo incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos 60 mg/kg semanalmente. En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran simultáneamente, en cuyo caso la dosis de cada anticuerpo administrado cae dentro de los rangos indicados.

El anticuerpo es usualmente administrado en ocasiones múltiples, Los intervalos entre las dosis múltiples puede ser semanalmente, mensual o anual. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indican mediante la medición de los niveles de sangre del anticuerpo a A $\beta$  en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para logra una concentración de anticuerpo del plasma de 1-1000  $\mu$ g/ml y en algunos métodos 25-300  $\mu$ g/ml. Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración de menos frecuentes. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la vida media más larga, seguido por anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos, y los anticuerpos no humanos.

La dosis y la frecuencia de administración puede variar dependiendo los entrenamientos profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las formulaciones que contienen los anticuerpos presentes o un cóctel de éstos se administran a un paciente ya no en estado de enfermedad para mejorar la resistencia del paciente. Tal cantidad se define como “una dosis profiláctica efectiva”. En este uso, las cantidades precisas dependen de nuevo del estado del paciente de la salud y la inmunidad general, pero generalmente varían desde 0.1 a 25 mg por dosis, especialmente 0.5 a 2.5 mg por dosis. Una dosis relativamente baja se administra a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo largo de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas.

En aplicaciones terapéuticas, una dosis relativamente alta (por ejemplo, desde aproximadamente 0.5 o 1 a aproximadamente 200 mg/kg de anticuerpo por dosis (por ejemplo 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10, 20, 25, 50, o 100 mg/kg), con las dosis desde 5 a 25 mg/kg siendo la más comúnmente utilizada) a intervalos relativamente cortos se requiere algunas veces hasta que se reduzca la progresión de la enfermedad o se termine, y preferiblemente hasta que el paciente muestre el mejoramiento parcial o completo de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, el paciente le puede ser administrado un régimen profiláctico.

Puede ser útil suministrar las formulaciones de la invención en forma de unidad de dosis para la fácil administración y la uniformidad de la dosificación. Las formulaciones de la invención se pueden presentar en cápsulas, ampollas o en recipientes multi-dosis. La forma de dosis unitaria puede comprender cualquier formulación descrita aquí que incluye suspensiones, soluciones o emulsiones del ingrediente activo junto con agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. En una modalidad de ejemplo, la unidad de dosis

farmacéutica se puede agregar a o reconstituir en una bolsa de goteo intravenoso (por ejemplo una bolsa de goteo de 50 ml, 100 ml, 250 ml, o 500 ml) con un diluyente adecuado, por ejemplo, una solución de agua o salina libre de pirógeno estéril, antes de la administración al paciente, por ejemplo, mediante infusión intravenosa. Algunas formas de dosis unitarias farmacéuticas pueden requerir reconstitución con un diluyente adecuado antes de la adición a una bolsa de goteo intravenoso, particularmente formas liofilizadas. En modalidades de ejemplo, la forma de dosis de la unidad farmacéutica es un recipiente que contiene una formulación descrita aquí. El término "recipiente" se refiere a algo, por ejemplo, un soporte, receptáculo, o recipiente, en el cual un objeto o líquido se puede colocar o contener, por ejemplo, para almacenamiento. Por ejemplo, el recipiente puede ser un frasco de tubería tipo I, de vidrio de 10 mL. Generalmente, el recipiente debe mantener la esterilidad y estabilidad de la formulación. Por ejemplo, el recipiente puede ser cerrado con un tapón de suero. Adicionalmente, en varias modalidades, el recipiente se debe diseñar con el fin de permitir el retiro de 100 mg de la formulación o ingrediente activo (por ejemplo, para uso simple). Alternativamente, el recipiente puede ser adecuado para cantidades mayores de formulación o ingrediente activo, por ejemplo, desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 5000 mg, desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1000 mg, y desde aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, aproximadamente 40 mg a aproximadamente 250 mg, aproximadamente 60 mg a aproximadamente 80 mg, aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg, aproximadamente 120 mg a aproximadamente 160 mg, o rangos o intervalos de este, por ejemplo, aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg. Los rangos intermedios a las cantidades anteriormente citadas, por ejemplo, desde aproximadamente 25 mg a aproximadamente 195 mg, también pretenden ser parte de esta invención. Por ejemplo, los rangos de valores que utilizan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente citados como límites superior y/o inferior pretenden estar incluidos. En

una modalidad particular, la formulación a menudo es abastecida con un líquido en forma de dosificación unitaria.

En otro aspecto, la presente invención suministra un kit que incluye una forma unitaria de dosificación farmacéutica (por ejemplo, un recipiente con una formulación descrita aquí), e instrucciones para uso. De acuerdo con esto, el recipiente y el kit se pueden diseñar para suministrar una formulación suficiente para usos múltiples. En varias modalidades, el kit puede incluir además un diluyente. El diluyente puede incluir excipientes, separados o combinados. Por ejemplo, el diluyente puede incluir un modificador de tonicidad tal como manitol, un agente amortiguante tal como histidina, un estabilizador tal como polisorbato 80, un antioxidante tal como metionina, y/o combinaciones de éstos. El diluyente puede contener otros excipientes, por ejemplo, lioprotectores, según se considera necesario por un experto en la técnica.

Las modalidades de uso adicionales de la invención se establecen en la sección de esta aplicación titulada "Resumen de la invención".

Esta invención se ilustra además en los siguientes ejemplos que no deben ser considerados como limitantes. Los contenidos de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas a lo largo de esta solicitud, así como también las figuras, se incorporan aquí como referencia.

## EJEMPLOS

En todos los ejemplos, los siguientes materiales y métodos fueron utilizados a menos que se establezca otra cosa.

### *Materiales y Métodos*

En general, la práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología (especialmente, por ejemplo, tecnología de anticuerpo), y técnicas estándar de separación de polipéptido. Ver, *por ejemplo*, Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning*: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); *Antibody Engineering Protocols* (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibody: A Laboratory Manual*, Harlow *et al.*, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); y *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992).

## EJEMPLO 1

### CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN POLIPÉPTIDO TERAPÉUTICO

En este ejemplo, se describe la clonación y expresión de un polipéptido terapéutico, en particular, un polipéptido de unión de antígeno, esto es, un anticuerpo capaz de unirse a A $\beta$ .

000009

Un anticuerpo de ejemplo para la formulación de acuerdo con los métodos de presente invención es el 3D6. El 3D6 mAb es específico para el N-terminal del A $\beta$  y se ha mostrado por mediar la fagocitosis (por ejemplo, inducir fagocitosis) de la placa amiloide 3D6 no reconoce el APP secretado o el APP de longitud completa, si no que detecta solamente las especies A $\beta$  con un ácido aspártico amino-terminal. Por lo tanto, el 3D6 es un anticuerpo específico de extremo. La línea celular designada RB96 3D6.32.2.4 que produce el anticuerpo 3D6 tiene un número de acceso ATCC PTA-5130, que ha sido depositado en Abril 8, 2003. La clonación, caracterización y humanización del anticuerpo 3D6 se describe en la Publicación de la Solicitud de Patente U.S. No. 20030165496 A1.

En resumen, la humanización del anticuerpo monoclonal de murino del péptido anti A $\beta$  péptido (designado como m3D6) se llevó a cabo al aislar las secuencias de ADN para las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada ( $V_L$  y  $V_H$ ) mediante reacción de cadena de polimerasa de transcripción (RT-PCR).

Con base en las secuencias de ADN m3D6  $V_L$  y  $V_H$  determinadas, se identificaron las regiones de estructura humana homólogas. Para asegurar que el anticuerpo humanizado retuvo la capacidad para interactuar con el antígeno de péptido A $\beta$ , los residuos de estructura  $V_L$  y  $V_H$  se retuvieron en la secuencia 3D6 humanizada para preservar la estructura total de las regiones de dominio constante (CDR) en el contexto de las secuencias de cadena ligera kapa y pesada IgG1 humanas. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias  $V_L$  y  $V_H$  3D6 humanizadas identificadas mediante este proceso (que incluyen la secuencia de señal 5' y la secuencia del donante del empalme de intrón 3') se fueron generados al hibridizar oligonucleótidos de ADN traslapantes sintetizados seguidos por reacciones de llenado y polimerasa de ADN. La integridad de cada una de las secuencias de la región variable humanizada se identifica

mediante la secuenciación de ADN. La figura 1 describe una representación esquemática de la estructura predicha de un anticuerpo 3D6 de péptido anti-A $\beta$  humanizado de ejemplo denominado h3D6v2. La figura 2 identifica las secuencias de aminoácido completas de las cadenas ligera y pesada h3D6v2.

El anticuerpo 3D6 humanizado se expresa mediante la transfección de la línea celular de huésped de Ovario de Hámster Chino (CHO) con los plásmidos de expresión que codifican la cadena ligera del anticuerpo anti-A $\beta$  y los genes de cadena pesada. Las células CHO que expresan el anticuerpo se aislaron utilizando procedimientos de selección de droga/amplificación de gen con base en metotrexato estándar. Una línea celular de clonación de CHO que exhibe la productividad deseada y los genotipos de crecimiento se selecciona y utiliza para establecer una línea celular que expresa anticuerpo utilizando un medio químicamente definido libre de los componentes derivados animales o humanos.

## EJEMPLO 2

### PREPARACIÓN DE UN POLIPÉPTIDO TERAPÉUTICO QUE UTILIZA UN BIRREACTOR A GRAN ESCALA

En este ejemplo, se describe la preparación de polipéptido terapéutico, en particular un anticuerpo anti-A $\beta$ .

El proceso de fabricación del polipéptido inicia con el descongelamiento de un cultivo de partida de células clonales que expresan establemente el anticuerpo anti-A $\beta$ .

Las células fueron cultivadas utilizando un medio químicamente definido que no contiene proteínas derivadas de animal o humano. Los cultivos fueron entonces expandidos y utilizados para inocular un biorreactor semilla, el cual a su vez se utiliza para inocular múltiples sitios de biorreactor de producción. La producción del biorreactor se opera en un modo de alimentación de tanda. Al final del ciclo de producción la cosecha del medio condicionado se clarifica mediante microfiltración en la preparación de un procesamiento corriente abajo adicional.

El proceso de purificación consiste de las etapas cromatográficas estándar seguidas por filtración. El anticuerpo purificado se concentra mediante ultrafiltración y se diafiltra en polisorbato 80 ausente del amortiguador de formulación. Opcionalmente, el polisorbato 80 (derivado vegetal) se agrega al grupo de retención de ultrafiltración/diafiltración, seguido por la filtración de retención bacteriana. La sustancia de drogas se almacena congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se mantiene para la elaboración adicional en un producto de droga, que incluye las formulaciones líquidas estabilizadas descritas aquí.

### **EJEMPLO 3**

#### **PREPARACIÓN DE UNA FORMULACIÓN DE POLIPÉPTIDO LÍQUIDA ESTABILIZADA**

En este ejemplo, se describe una composición típica de una formulación de polipéptido líquida estabilizada.

Dos tandas de producto de droga de anticuerpo se elaboran. Una tanda inicial se elabora al componer la sustancia de droga en una formulación libre de proteína animal y humana que contiene 20 mg de la sustancia activa de anticuerpo anti-A $\beta$  por mL, 10 mM de histidina, 10 mM de metionina, 4% de manitol, 0.005% de polisorbato 80, pH 6.0. El producto de droga fue asépticamente llenado en frascos, a 100 mg de sustancia activa/frasco de anticuerpo anti-A $\beta$ . El frasco de producto de droga terminado no contenía preservativos y se destina solamente a un uso simple.

Una segunda tanda de producto de droga se elabora mediante un método similar utilizando un amortiguador de formulación sin polisorbato 80.

#### **EJEMPLO 4**

#### **ANÁLISIS DE FORMULACIONES DE POLIPÉPTIDOS LÍQUIDOS ESTABILIZADOS**

En este ejemplo, se describe el análisis de varias formulaciones de polipéptido líquido estabilizadas.

La estabilidad, y en particular, la integridad físico química (tal como la agregación y desamidación) de la formulación fueron evaluadas mediante los siguientes métodos bien conocidos en la técnica: aparición; pH; concentración de proteína (A280); ELISA, en parte como ensayo de bioactividad; electrofóresis de gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), en parte como un ensayo de agregación; cromatografía líquida de alto desempeño de exclusión de tamaño (SEC-HPLC), en parte; cromatografía líquida de alto desempeño de intercambio de cationes (CEX-HPLC), en parte, como un ensayo de amidación y estabilidad en general; y un mapeo de péptido.

Estos métodos evaluaron la recuperación y la integridad de la proteína bajo las condiciones de ensayo a varias temperaturas.

El análisis de aparición de las formulaciones se conduce con el fin de determinar la calidad de las formulaciones en varios puntos de tiempo. El análisis se conduce con base en la inspección visual para claridad, color y la presencia de partículas. Por ejemplo, el grado de opalescencia se analiza en términos de las suspensiones de referencia. El análisis de aparición de las formulaciones hecho con y sin polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demostró que ambas formulaciones fueron aceptables cuando se almacenaron cada una a  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ , y  $40^{\circ}\text{C}$  en cada uno de los siguientes puntos de tiempo: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, y 12 meses.

El análisis de pH busca determinar el mantenimiento del pH de la formulación dentro de un rango aceptable de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.5. El análisis de pH de las formulaciones hecho con y sin el polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demuestra que ambas formulaciones eran aceptables cuando se almacenaban cada una a  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ , y  $40^{\circ}\text{C}$  en cada uno de los siguientes puntos de tiempo: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, y 12 meses. En general, el pH nunca varía por debajo de 5.8 o por encima de 6.2.

El análisis de concentración de proteína mediante ensayos A280 se desarrolla para determinar el mantenimiento de la concentración de la proteína de formulación dentro de un rango aceptable de aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml. El análisis de concentración de proteína de la formulación hecho con y sin polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demostró que ambas formulaciones fueron generalmente aceptables cuando se almacenaron cada una a  $-80^{\circ}\text{C}$

C, 5° C, 25° C, y 40° C en cada uno de los siguientes puntos de tiempo: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, y 12 meses. Con la excepción de las concentraciones de proteína que varía ligeramente por encima de 23 mg/ml para la formulación sin el polisorbato 80 cuando se almacena a 5° C, 25° C, y 40° C en los puntos de tiempo de 3 meses, la concentración de proteína permanece sin embargo dentro de rangos aceptables. De acuerdo con esto, el análisis de concentración de proteína no demuestra pérdida detectable de proteína que ocurra a unas condiciones aceleradas, particularmente para las formulaciones con polisorbato 80. Más aún, la concentración de proteína generalmente falla en demostrar un tiempo o cambio dependiente de temperatura significativo subsecuente al punto de tiempo inicial.

El mantenimiento de la actividad biológica se ensaya, en parte, mediante técnicas ELISA. La actividad biológica se analiza como BU/mg con una actividad aceptable que  $\geq 2500$  BU/mg o 50% (es decir, 5000 BU/mg que igual al 100%). El análisis ELISA de las formulaciones hecha con o sin polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demostró que ambas formulaciones fueron generalmente aceptables cuando se almacenaron cada una a -80° C, 5° C, 25° C, y 40° C en cada uno de los siguientes puntos de tiempo: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, y 12 meses. Con la excepción de la actividad biológica que varía ligeramente por debajo del 50% en el punto de tiempo de los 12 meses para ambas formulaciones cuando se almacena a 40° C, la actividad biológica permanece sin embargo dentro de rangos aceptables.

El análisis SEC-HPLC se conduce como un ensayo de agregación, pureza y estabilidad en general. El SEC-HPLC corre bajo condiciones que utilizan cromatografía de fase móvil con un amortiguador dibásico de fosfato de sodio indicando que la formulación era aceptable si el análisis SEC-HPLC identificaba  $\geq$  al 90% del monómero

IgG, comparado con el porcentaje del producto de alto peso molecular y el producto de bajo peso molecular. El análisis SEC-HPLC de las formulaciones hecho con y sin el polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demostró que ambas formulaciones fueron generalmente aceptables cuando se almacenaron cada una a  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ , y  $40^{\circ}\text{C}$  en cada uno de los siguientes puntos de tiempo: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, y 12 meses. Con la excepción del porcentaje de monómero que varía por debajo del 90% para ambas formulaciones cuando se almacena a  $40^{\circ}\text{C}$  en cada punto de tiempo y después de 6 meses (donde se identificó un análisis mayor de al menos el 10% del producto de bajo peso molecular para ambas formulaciones en cada punto de tiempo), el monómero porcentual estuvo sin embargo dentro de un rango aceptable. El análisis SEC-HPLC demostró en general que aunque los perfiles de alto peso molecular y bajo peso molecular fueron diferentes durante el tiempo en las muestras con y sin polisorbato, la forma monomérica del anticuerpo generalmente permaneció constante por ejemplo en el punto de tiempo de 12 meses, cuando la formulación se almacenó a  $5^{\circ}\text{C}$ .

El análisis CEX-HPLC se condujo como un ensayo de aminación y estabilidad en general. El CEX-HPLC corre bajo condiciones que utilizan cromatografía de fase móvil con un amortiguador de NaCl produciendo un perfil de dilución y los tiempos de retención de picos predominantes que fueron analizados por ser comparables o no comparables con los perfiles estándares de referencia. El análisis CEX-HPLC de las formulaciones hecho con y sin el polisorbato 80 de acuerdo con la presente invención demostró que ambas formulaciones fueron generalmente aceptables cuando se almacenaron cada una a  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ , y  $40^{\circ}\text{C}$  en cada uno de los siguientes puntos de tiempo: inicial, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, y 12 meses. Con la excepción del perfil de elusión y el tiempo de retención de los picos predominantes que no son comparables para ambas formulaciones cuando se

almacenan a 40° C en cada punto de tiempo en y después de 3 meses, los picos predominantes fueron sin embargo comparables con los picos de referencia.

En general, el análisis de las formulaciones con polisorbato 80 almacenado a 5° C permitió las siguientes conclusiones particularmente importantes: 1) opalescencia, pH, ELISA, CEX-HPLC, SEC-HPLC y análisis SDS-PAGE todos mostraron cambios mínimos en la formulación durante los 9 meses; 2) formulaciones almacenadas a 5° C aparecían más como las muestras de referencia durante los 9 meses que las muestras aceleradas; 3) el mapeo de péptido mostró cambios a 5° C; y 4) los datos de la tendencia del SEC-HPLC a 5° C predijeron al menos 17.2 meses de estabilidad (ver figura 6), sin embargo, luego de remover la columna, la variabilidad del instrumento y el amortiguador, los datos permitieron una producción mayor de 30 meses de estabilidad (ver figura 7). Adicionalmente, las mezclas aceleradas con polisorbato 80 almacenadas a 25° C pasaron todas las especificaciones a los 9 meses (figura 4).

Más aún, el análisis de las formulaciones sin polisorbato 80 almacenado a 5° C permitieron las siguientes conclusiones particularmente importantes: 1) opalescencia, pH, y análisis ELISA todos mostraron cambios mínimos en la formulación durante los 9 meses; 2) los resultados del CEX-HPLC y SDS PAGE mostraron hallazgos comparables a las muestras de referencia o el control a -80° C a los 9 meses; 3) el análisis SEC-HPLC mostró cambios menores durante los 9 meses aunque los cambios fueron más pronunciados a temperaturas aceleradas; y 4) los datos de la tendencia del SEC-HPLC predijeron al menos 18 meses de estabilidad, aún con temas de variabilidad de ensayo (ver figura 8).

Las figuras 3-5 son descripciones gráficas de las predicciones de vida de almacenamiento para las formulaciones (con y sin PS80), hecha de acuerdo con

presente invención y almacenada a 5° C, 25° C, y 40° C, respectivamente. En general, las figuras 3-5 indican que el almacenamiento de las formulaciones de la presente invención a temperaturas mayores reducen la vida de almacenamiento esperada. La figura 3, en particular, indica que la formulación tiene una vida de almacenamiento esperada de al menos 18 meses cuando la formulación se almacena a 5° C. La figura 4 indica el almacenamiento de la formulación a temperatura ambiente (25° C) puede servir para reducir la vida de almacenamiento esperada a aproximadamente 12 meses. La figura 5 demuestra adicionalmente que el almacenamiento de la formulación a 40° C puede servir para reducir la vida de almacenamiento esperada a aproximadamente 4 meses. Aún adicionalmente, la figura 9 indica que en por ejemplo 5° C en 12 meses, el PS80 reduce la presencia de los subproductos de alto peso molecular, por ejemplo, agregados de polipéptido.

## **EJEMPLO 5**

### **ESTUDIOS DE ESTABILIDAD EN USO DE METIONINA COMO UN ANTIOXIDANTE**

En este ejemplo, se describe el análisis de las varias formulaciones de polipéptido líquido estabilizadas con un antioxidante, en particular, metionina.

Los estudios fueron conducidos para determinar el efecto de la metionina para mantener la estabilidad de un anticuerpo en una formulación de anticuerpo terapéutica. El análisis SEC-HPLC se condujo durante 6 meses a varias temperaturas sobre cuatro muestras anticuerpos (un anticuerpo anti-CD22 IgG4): una formulación de anticuerpo con 20 mM de succinato a pH de 6.0; una formulación de anticuerpo con 20 mM de succinato y 10 mM de metionina; una formulación de anticuerpo con 20 mM de succinato y 0.01% de PS80; y una formulación de anticuerpo con 20 mM de succinato,

10 mM de metionina y 0.01% de PS80. En general, los resultados indicaron que la metionina disminuye deseadamente la formación de alto peso molecular (HMW), por ejemplo, la formación de agregados. Más aún, la metionina disminuye el incremento de la dependencia de temperatura en el porcentaje de HMW (ver figura 10).

Adicionalmente, un estudio de estabilidad de pH (a pH 5.8, 6.0 y 6.2) se condujo durante 6 semanas a varias temperaturas (5° C y 40° C) en las siguientes cuatro muestras de anticuerpo (un anticuerpo anti-B7.2 IgG<sub>2</sub>): (1) una muestra que incluye anticuerpo, 10 mM de histidina y 150 mM de NaCl; (2) una muestra que incluye anticuerpo, 10 mM de histidina, 150 mM de NaCl y 0.01% de PS80; (3) una muestra que incluye anticuerpo, 10 mM de histidina, 150 mM de NaCl y 10 mM de metionina; y (4) una muestra que incluye anticuerpo, 10 mM de histidina, 150 mM de NaCl, 10 mM de metionina y 0.01% de PS80. Se condujo un análisis SEC-HPLC. Los resultados demostraron que la metionina disminuye el incremento dependiente de temperatura en el porcentaje de formación de subproducto (por ejemplo, subproductos HMW) sobre el rango de pH indicado, (ver figura 11). Como se muestra en la figura 11, las muestras que contienen metionina desplegaron una baja cantidad de agregación cuando se mantuvieron a 0° C durante 6 semanas, lo cual es similar a aquellas muestras mantenidas a 5° c durante 6 semanas.

## **EJEMPLO 6**

### **ANÁLISIS DE EXCIPIENTE DE FORMULACIONES DE POLIPÉPTIDO LÍQUIDO ESTABILIZADAS UTILIZANDO CALORIMETRÍA DE EXPLORACIÓN DIFERENCIAL**

En este ejemplo, se describe el análisis de excipiente de varias formulaciones de polipéptido líquido que utilizan diferente calorimetría de exploración.

Una meta primaria de la formulación de droga de proteína es estabilizar una proteína en su forma biológicamente activa nativa. Típicamente esto se puede hacer al seleccionar varios excipientes en una formulación base y monitorear su efecto sobre el peso molecular de la molécula y la actividad. Estos parámetros son indicativos de estabilidad. Otra medición de la estabilidad es la desnaturalización térmica que se puede utilizar monitoreando una variedad de técnicas biofísicas. En general, los niveles crecientes de la estabilidad de la proteína se han atribuido a la alta fusión, desnaturalización o las temperaturas de descomposición. De acuerdo con esto, las propiedades térmicas de un polipéptido de unión de antígeno de ejemplo, en particular, un anticuerpo monoclonal IgG1 se monitoreó en la presencia de varios excipientes que utilizan Calorimetría de Exploración Diferencial Capilar VP. Específicamente, el  $T_{ms}$  aparente se determinó para las formulaciones que contienen 10 mM de histidina (pH 6.0) con varios excipientes. Se muestran varios excipientes que suministran una estabilidad térmica incrementada o decreciente. En razón a que los niveles crecientes de estabilidad de la proteína se han tribuido a temperaturas de fusión alta, los excipientes en las muestras que imparten un  $T_{m2}$  o  $T_{m3}$  creciente, comparados con los valores  $T_{m2}/T_{m3}$  de control (respectivamente, 74.9° C y 83.4° C), fueron considerados excipientes especialmente deseables (ver Tabla 1 adelante).

De acuerdo con esto, se concluyó que los excipientes tales como glucosa (formulada a una concentración de 4% y 10%), sucrosa (formulada a una concentración de 4% y 10%), sorbitol (formulado a una concentración de 4% y 10%), y manitol (formulado a una concentración de 4% y 10%), se desarrollaron especialmente bien para estabilizar una formulación de polipéptido líquida, en particular, una formulación IgG de anticuerpo.

Tabla 1 Resultados de Análisis de Excipiente

| Excipiente          | Concentración | T <sub>m</sub> 1* | T <sub>m</sub> 2* | T <sub>m</sub> 3* |
|---------------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Histidina (Control) | 10 mM         | -                 | 74.9              | 83.4              |
| NaCl                | 10 mM         | 69.3              | 74.8              | 82.9              |
|                     | 100 mM        | 67.9              | 74.4              | 82.4              |
|                     | 500 mM        | 66.5              | 74.5              | 81.9              |
|                     | 1 M           | 65.4              | 74.9              | 82.3              |
| CaCl2               | 10 mM         | 68.7              | 74.6              | 82.7              |
|                     | 100 mM        | 68.5              | 74.5              | 82.4              |
| Metionina           | 30 mM         | -                 | 74.5              | 83.7              |
| Vitamina C          | ~30 mM        | 52.2              | 68.7              | -                 |
| Polisorbato 20      | 0.005%        | -                 | 74.5              | 83.7              |
|                     | 0.01%         | -                 | 74.5              | 83.8              |
|                     | 0.1%          | -                 | 74.4              | 83.7              |
| Polisorbato 80      | 0.005%        | -                 | 74.6              | 83.8              |
|                     | 0.01%         | -                 | 74.5              | 83.7              |
|                     | 0.1%          | -                 | 74.5              | 83.7              |
| Glucosa             | 0.5%          | -                 | 74.7              | 83.8              |
|                     | 2%            | -                 | 74.9              | 83.9              |
|                     | 4%            | -                 | 75.0              | 84.3              |
|                     | 10%           | -                 | 75.8              | 84.9              |
| Sucrosa             | 0.5%          | -                 | 74.6              | 83.6              |

|          |      |   |      |      |
|----------|------|---|------|------|
|          | 2%   | - | 74.8 | 83.8 |
|          | 4%   | - | 75.0 | 83.9 |
|          | 10%  | - | 75.5 | 84.4 |
| Sorbitol | 0.5% | - | 74.8 | 83.6 |
|          | 2%   | - | 75.0 | 83.8 |
|          | 4%   | - | 75.2 | 84.1 |
|          | 10%  | - | 75.9 | 84.8 |
| Manitol  | 0.5% | - | 74.8 | 83.6 |
|          | 2%   | - | 74.9 | 83.8 |
|          | 4%   | - | 75.2 | 84.1 |
|          | 10%  | - | 75.9 | 84.8 |

\* En el control (10 mM de histidina, pH 6.0) se observaron dos transiciones T<sub>m</sub>2 y T<sub>m</sub>3. Una transición temprana (T<sub>m</sub>1) se vio en la presencia de algunos excipientes.

**Equivalentes**

Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de aseverar utilizando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descrita aquí. Tales equivalentes pretenden estar comprendidos por las siguientes reivindicaciones.

## **REIVINDICACIONES**

Reivindicamos:

1. Una formulación líquida que comprende,  
  
un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo, en donde el polipéptido exhibe formación de subproducto durante el almacenamiento, y  
  
un antioxidante, en donde dicho antioxidante está presente en una cantidad suficiente para reducir la formación de subproducto del polipéptido durante el almacenamiento de la formulación.
2. La formulación de la reivindicación 1, en donde el componente de polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo, un fragmento Fv de anticuerpo, un fragmento Fab de anticuerpo, un fragmento Fab'(2) de anticuerpo, un fragmento Fd de anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple (scFv), un fragmento de anticuerpo de dominio simple (Dab), un polipéptido de lámina plegada beta que comprende al menos una región determinante de complementariedad de anticuerpo (CDR), y un polipéptido no globular que comprende al menos una región determinante de complementariedad de anticuerpo.
3. La formulación de la reivindicación 1, en donde el polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo es un anticuerpo.

4. La formulación de la reivindicación 3, en donde el anticuerpo es un subtipo seleccionado del grupo que consiste de IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4.
5. La formulación de la reivindicación 3, en donde el subproducto se selecciona del grupo que consiste de un agregado de polipéptido de alto peso molecular, producto de degradación de polipéptido de bajo peso molecular, y combinaciones de estos.
6. La formulación de la reivindicación 5, en donde el agregado de alto peso molecular se selecciona del grupo que consiste de complejos anticuerpo:anticuerpo, complejos de anticuerpo:fragmento de anticuerpo; complejos de fragmento de anticuerpo:fragmento de anticuerpo, y combinaciones de estos.
7. La formulación de la reivindicación 5, en donde el producto de degradación del polipéptido de bajo peso molecular se selecciona del grupo que consiste de una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, un complejo de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, y combinaciones de estos.
8. La formulación de la reivindicación 1, en donde el antioxidante se selecciona del grupo que consiste de metionina y un análogo de estos.
9. La formulación de la reivindicación 8, en donde la metionina está presente en una cantidad de aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 25 mM.

10. La formulación de la reivindicación 8, en donde la metionina está presente en una cantidad de aproximadamente 10 mM.
11. La formulación de la reivindicación 1, en donde la formulación es adecuada para administrar parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intracranealmente, o epiduralmente.
12. La formulación de la reivindicación 1, en donde la formulación es capaz de atravesar la barrera sangre-cerebro.
13. La formulación de la reivindicación 1, en donde la formulación comprende además un agente de tonicidad.
14. La formulación de la reivindicación 13, en donde el agente de tonicidad es manitol.
15. La formulación de la reivindicación 13, en donde la formulación es adecuada para administración intravenosa.
16. La formulación de la reivindicación 1, en donde la formulación comprende además histidina.
17. Una formulación líquida que comprende un polipéptido de unión de antígeno, metionina, histidina, y manitol.

18. La formulación de la reivindicación 17, en donde la formulación es adecuada para administración intravenosa.
19. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polipéptido de unión de antígeno se une a un antígeno de una clase de antígeno seleccionada del grupo que consiste de antígenos de cáncer, antígenos autoinmunes, alérgenos, y patógenos.
20. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polipéptido de unión de antígeno está presente desde aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.
21. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polipéptido de unión de antígeno está presente en aproximadamente 17 mg/ml.
22. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde el polipéptido de unión de antígeno está presente en aproximadamente 20 mg/ml.
23. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde el polipéptido de unión de antígeno está presente en aproximadamente 30 mg/ml.

24. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 14 y 17-23, en donde el manitol está presente en una cantidad suficiente para mantener la isotonicidad de la formulación.
25. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 14 y 17-24, en donde el manitol está presente desde aproximadamente 2% p/v a aproximadamente 10% p/v.
26. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 14 y 17-24, en donde el manitol está presente en aproximadamente 4% p/v.
27. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 14 y 17-24, en donde el manitol está presente en aproximadamente 6% p/v.
28. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 14 y 17-24, en donde el manitol está presente en aproximadamente 10% p/v.
29. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 16-28, en donde la histidina está presente en una cantidad suficiente para mantener un pH fisiológicamente adecuado.
30. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 16-29, en donde la histidina está presente desde aproximadamente 0.1 mM a aproximadamente 25 mM.

31. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 16-29, en donde la histidina está presente en aproximadamente 10 mM.
32. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un estabilizador.
33. La formulación de la reivindicación 32, en donde el estabilizador comprende polisorbato 80.
34. La formulación de la reivindicación 33, en donde el polisorbato 80 está presente desde aproximadamente 0.001% p/v a aproximadamente 0.01% p/v.
35. La formulación de la reivindicación 33, en donde el polisorbato 80 está presente en aproximadamente 0.005% p/v.
36. La formulación de la reivindicación 33, en donde el polisorbato 80 está presente en aproximadamente 0.01% p/v.
37. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9.
38. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 7.

39. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable al congelamiento.
40. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable durante al menos aproximadamente 12 meses.
41. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable durante al menos aproximadamente 18 meses.
42. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable durante al menos aproximadamente 24 meses.
43. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable durante al menos aproximadamente 30 meses.
44. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable a aproximadamente  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta aproximadamente  $40^{\circ}\text{C}$ .
45. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable a aproximadamente  $0^{\circ}\text{C}$  hasta aproximadamente  $25^{\circ}\text{C}$ .
46. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es estable a aproximadamente  $2^{\circ}\text{C}$  hasta aproximadamente  $8^{\circ}\text{C}$ .

47. Una forma de dosis unitaria farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de la formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para tratar enfermedad en un paciente por vía de la administración de dicha forma de dosificación a dicho paciente.
48. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 47 que es un recipiente que contiene dicha formulación.
49. El recipiente de la reivindicación 47, el cual es un frasco que contiene aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2000 mg de dicho polipéptido de unión A $\beta$ .
50. El recipiente de la reivindicación 47, que es un frasco que contiene aproximadamente 50 mg a aproximadamente 1500 mg de dicho polipéptido de unión A $\beta$ .
51. El recipiente de la reivindicación 47, que es un frasco que contiene aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg de dicho polipéptido de unión A $\beta$ .
52. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 47, en donde dicho frasco tiene un volumen de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 ml.

53. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 47, en donde dicho frasco tiene un volumen de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 ml.
54. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 47-53, adecuada para infusión intravenosa a dicho paciente.
55. Un kit que comprende,
  - a) la forma de dosificación unitaria farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 47-54; y
  - b) instrucciones para uso.
56. Un recipiente que comprende una forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 47 la cual es un recipiente etiquetado para uso.
57. El recipiente de la reivindicación 56 etiquetado para uso profiláctico.
58. El recipiente de la reivindicación 56 etiquetado para uso terapéutico.
59. Un método para incrementar la estabilidad de un polipéptido de unión de antígeno en una formulación farmacéutica líquida, en donde el polipéptido exhibe formación de subproducto durante almacenamiento en una formulación líquida, el método comprende incorporar en la formulación un anti-oxidante en una cantidad suficiente para reducir la cantidad de formación de subproducto del polipéptido.

60. El método de la reivindicación 59, en donde el componente de polipéptido de unión de antígeno se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo, un fragmento Fv de anticuerpo, un fragmento Fab de anticuerpo, un fragmento Fab'(2) de anticuerpo, un fragmento Fd de anticuerpo, un anticuerpo de cadena simple (scFv), un fragmento de anticuerpo de dominio simple (Dab), un polipéptido de lámina plegada beta que comprende al menos una región determinante de complementariedad de anticuerpo (CDR), y un polipéptido no globular que comprende al menos una región determinante de complementariedad de anticuerpo.
61. El método de la reivindicación 59, en donde el subproducto se selecciona del grupo que consiste de un agregado de polipéptido de alto peso molecular, un producto de degradación de polipéptido de bajo peso molecular, y combinaciones de estos.
62. El método de la reivindicación 59, en donde el antioxidante se selecciona del grupo que consiste de metionina y un análogo de estos.
63. Un método para preparar la formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-46, que comprende combinar los excipientes de la formulación.
64. Un método para preparar la formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-46, que comprende combinar el polipéptido de unión de antígeno con uno o más diluyentes, en donde dicho uno o más diluyentes comprenden los excipientes de la formulación.

65. Un método para preparar una forma de dosis unitaria farmacéutica que comprende combinar la formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-46 en un recipiente adecuado.
66. Un método para preparar la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-46 que comprende combinar una solución que comprende el polipéptido de unión de antígeno y al menos una porción de los excipientes con un diluyente que comprende el resto de los excipientes.
67. Una formulación estable durante al menos aproximadamente 12 meses a una temperatura por encima del congelamiento hasta aproximadamente 10° C y tiene un pH de aproximadamente 5.5 hasta aproximadamente 6.5, que comprende:
- i. al menos el polipéptido de unión de antígeno a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml;
  - ii. manitol a una concentración de aproximadamente 4% p/v o NaCl a una concentración de aproximadamente 150 mM;
  - iii. aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM de histidina o succinato; y
  - iv. 10 mM de metionina.

68. La formulación de la reivindicación 67, en donde la formulación es estable durante al menos aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2° C a 8° C, y comprende polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0.001% p/v a aproximadamente 0.01% p/v.
69. La formulación de la reivindicación 67, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 6.5 y comprende aproximadamente 10 mg/ml de polipéptido de unión a antígeno, aproximadamente 10 mM de histidina y aproximadamente 4% p/v manitol y aproximadamente .005% p/v polisorbato 80.
70. La formulación de la reivindicación 67, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 6.2 y comprende aproximadamente 20 mg/ml de polipéptido de unión a antígeno, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 4% p/v manitol y aproximadamente .005% p/v polisorbato 80.
71. La formulación de la reivindicación 67, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 6.2 y comprende aproximadamente 30 mg/ml de polipéptido de unión a antígeno, aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 4% p/v manitol y aproximadamente .005% p/v polisorbato 80.
72. La formulación de la reivindicación 71, que comprende además aproximadamente 4% p/v manitol.

73. La formulación de la reivindicación 71, que comprende además polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0.001% p/v a aproximadamente 0.01% p/v.
74. La formulación de la reivindicación 73, que comprende aproximadamente 0.005% p/v polisorbato 80.
75. La formulación de la reivindicación 71, en donde el polipéptido de unión de antígeno está presente a una concentración de aproximadamente 17 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml.
76. Una formulación estable durante al menos aproximadamente 24 meses a una temperatura de aproximadamente 2° C hasta aproximadamente 8° C y tiene un pH de aproximadamente 5.5 hasta aproximadamente 6.5, que comprende aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 23 mg/ml de un polipéptido de unión de antígeno, aproximadamente 10 mM de succinato, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 4% p/v de manitol y aproximadamente 0.005% p/v polisorbato 80.
77. Una formulación estable cuando se descongela desde aproximadamente -50° C a aproximadamente -80° C, comprende aproximadamente 40 a aproximadamente 60 mg/ml de polipéptido de unión de antígeno, aproximadamente 1.0 mg/ml a aproximadamente 2.0 mg/ml histidina, aproximadamente 1.0mg/ml a 2.0 mg/ml metionina y aproximadamente 0.05 mg/ml polisorbato 80, en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0.

78. La formulación de la reivindicación 77, en donde el manitol está excluido.
79. Una formulación que comprende aproximadamente 20 mg/ml de polipéptido de unión a antígeno, aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 4% de manitol y que tiene un pH de aproximadamente 6.
80. Una formulación que comprende aproximadamente 30 mg/ml de polipéptido de unión a antígeno, aproximadamente 10 mM de succinato, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 6% de manitol y tiene un pH de aproximadamente 6.2.
81. Una formulación que comprende aproximadamente 20 mg/ml de polipéptido de unión a antígeno, aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 4% de manitol, aproximadamente 0.005% de Polisorbato 80, y que tiene un pH de aproximadamente 6.
82. Una formulación que comprende aproximadamente 10 mg/ml de polipéptido de unión a antígeno, aproximadamente 10 mM de succinato, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 10% de manitol, aproximadamente 0.005% de Polisorbato 80, y que tiene un pH de aproximadamente 6.5.
83. Una formulación que comprende aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 20 mg/ml de polipéptido de unión a antígeno, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina,

aproximadamente 4% de manitol, aproximadamente 0.005% de Polisorbato 80, y tiene un pH de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 6.5.

84. Una formulación que comprende aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 20 mg/ml de polipéptido de unión a antígeno, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM de L-histidina, aproximadamente 10 mM de metionina, aproximadamente 150 mM de NaCl, aproximadamente 0.005% de Polisorbato 80, y tiene un pH de aproximadamente 6.0 a aproximadamente 6.5.
85. Una forma de dosificación unitaria farmacéutica, comprende una formulación que comprende:
- a. aproximadamente 10 mg a aproximadamente 250 mg de un polipéptido de unión de antígeno;
  - b. aproximadamente 4% de manitol o aproximadamente 150 mM de NaCl;
  - c. aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM de histidina o succinato; y
  - d. aproximadamente 10 mM de metionina
86. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 85, que comprende aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.1% de Polisorbato 80.

87. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 86, que comprende aproximadamente 40 mg a aproximadamente 60 mg del polipéptido de unión de antígeno.
88. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 86, que comprende aproximadamente 60 mg a aproximadamente 80 mg del polipéptido de unión de antígeno.
89. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 86, que comprende aproximadamente 80 mg a aproximadamente 120 mg del polipéptido de unión de antígeno.
90. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 86, que comprende aproximadamente 120 mg a aproximadamente 160 mg del polipéptido de unión de antígeno.
91. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 86, que comprende aproximadamente 160 mg a aproximadamente 240 mg del polipéptido de unión de antígeno.
92. Un producto terapéutico, que comprende:
- a. un frasco de vidrio, que comprende una formulación que comprende:
    - i. aproximadamente 10 mg a aproximadamente 250 mg de un polipéptido de unión de antígeno,

00198

- ii. aproximadamente 4% de manitol o aproximadamente 150 mM de NaCl,
  - iii. aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM de histidina, y
  - iv. aproximadamente 10 mM de metionina; y
- b. etiquetar para uso que comprende las instrucciones para utilizar el volumen apropiado necesario para lograr una dosis de aproximadamente 0.15 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg.
93. El producto terapéutico de la reivindicación 92, en donde la dosis es aproximadamente .5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg.
94. El producto terapéutico de la reivindicación 92, en donde la dosis es aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg.
95. El producto terapéutico de la reivindicación 92, en donde la concentración de polipéptido de unión de antígeno es aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml.
96. El producto terapéutico de la reivindicación 92, en donde la concentración de polipéptido de unión de antígeno es aproximadamente 20 mg/ml.

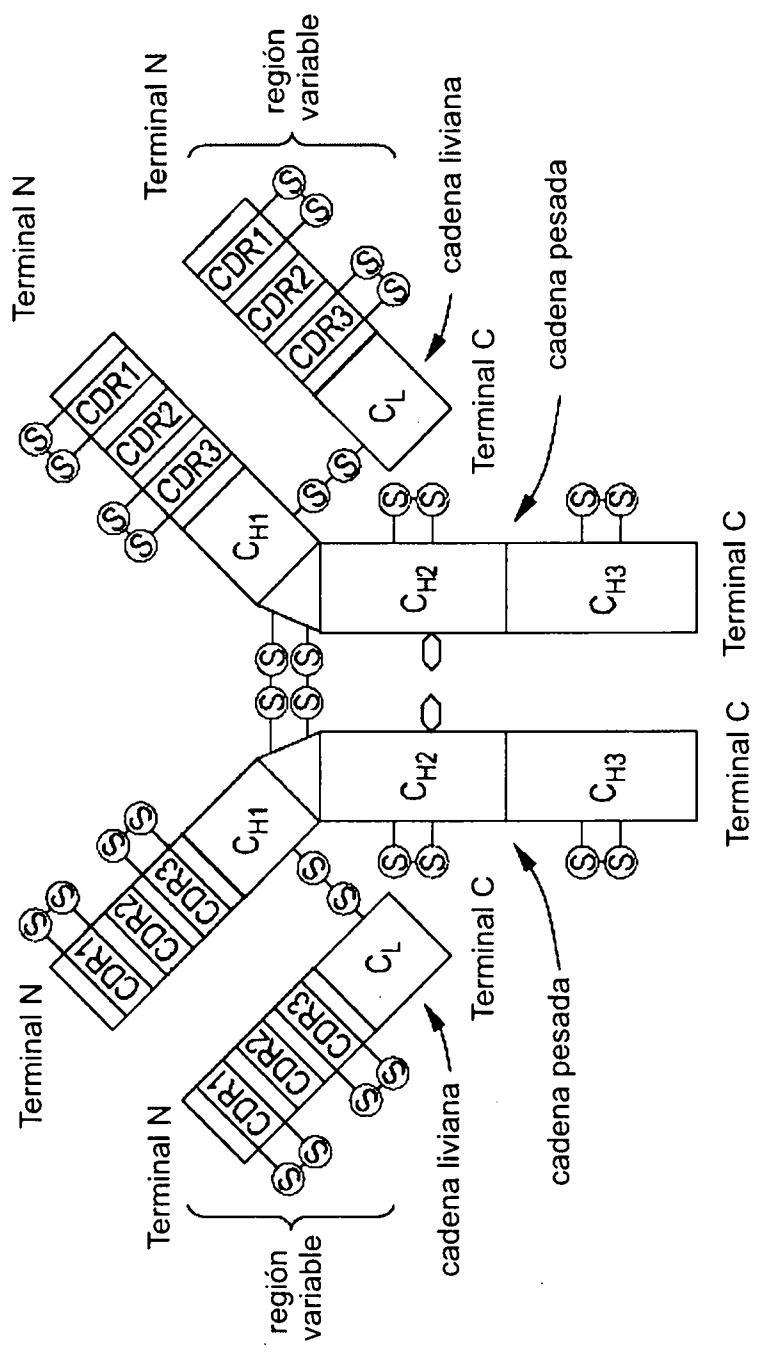
97. El producto terapéutico de la reivindicación 92, que comprende además aproximadamente 0.005% de Polisorbato 80.
98. El producto terapéutico de la reivindicación 92, en donde el uso es una administración subcutánea.
99. El producto terapéutico de la reivindicación 92, en donde el uso es una administración intravenosa.

## FORMULACIONES DE POLIPÉPTIDO ESTABILIZADAS

### *Resumen de la Descripción*

La presente invención suministra formulaciones para mantener la estabilidad de los polipéptidos, en particular, los polipéptidos de unión de antígeno terapéuticos tales como anticuerpos y similares, por ejemplo, anticuerpos anti-A $\beta$ . Las formulaciones generalmente incluyen un antioxidante en una cantidad suficiente como para inhibir la formación de subproducto, por ejemplo, la formación de agregados de polipéptido de alto peso molecular, fragmentos de degradación de polipéptido de bajo peso molecular, mezclas de estos. Las formulaciones de la invención opcionalmente comprenden un agente de tonicidad, tal como manitol, y un agente amortiguante o aminoácido tal como histidina, y así, las formulaciones son adecuadas para varias diferentes rutas de administración.

FIG. 1



# FIG. 2

## Cadena Liviana

1 DVVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQKPGQSPQ  
 51 RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCWQGTHERP  
 101 RTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK  
 151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSL SSSLTSLKAD YEKHKVYACE  
 201 VTHQGLSPV TKSFNRGEC

→ Cadena Pesada

## Cadena Pesada

1 EVOLLESGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYGMSWVRQA PGKGLEWVAS  
 51 IRSGGERTYY SDNVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCVRYD  
 101 HYSGSSDYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
 151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVQLQSSG LYSLSVWTV PSSSLGTQTY  
 201 ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGCP SVFLFPPKPK

← Cadena Liviana → Cadena Pesada

251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
 301 TYRVSFVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
 351 YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFIYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL  
 401 DSDGSFFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG (K)

FIG. 3A

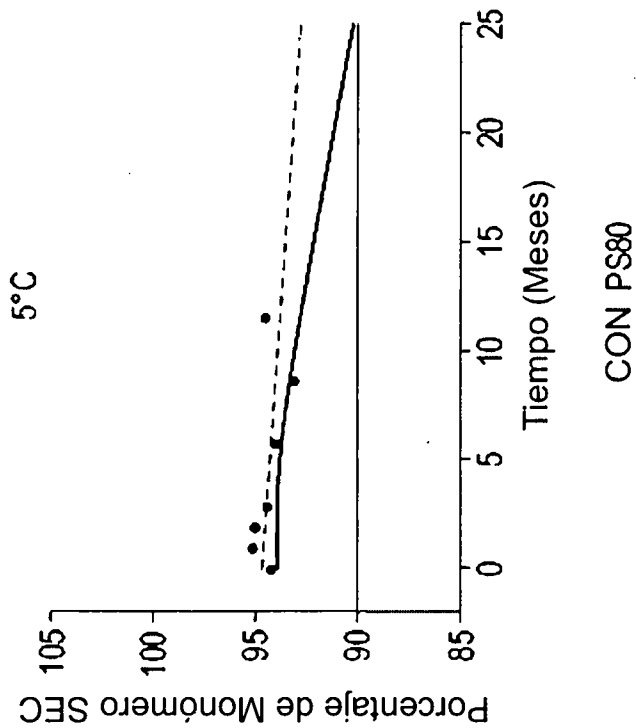


FIG. 3B

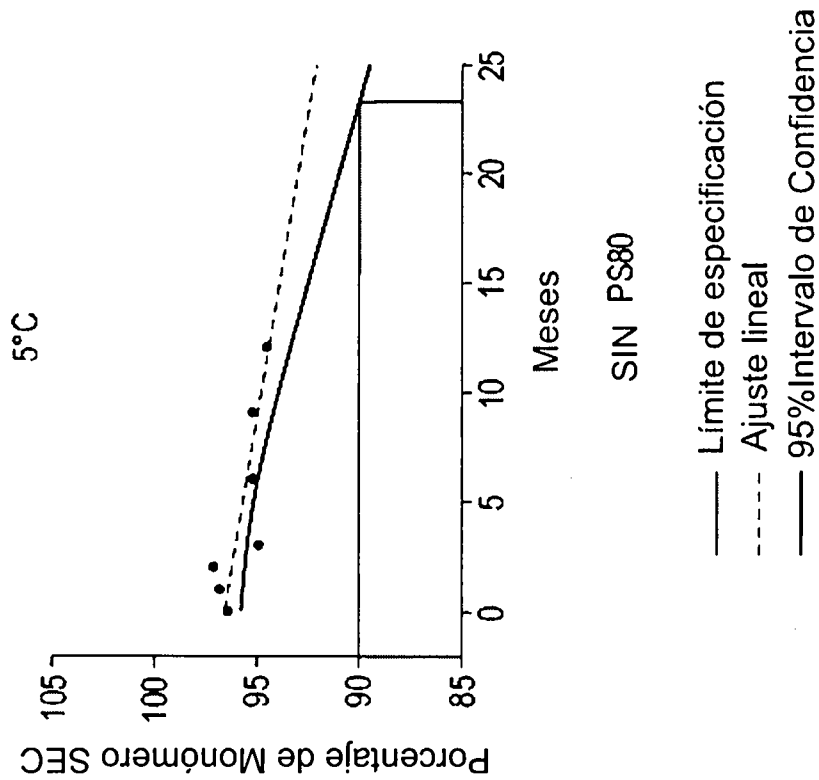


FIG. 4A

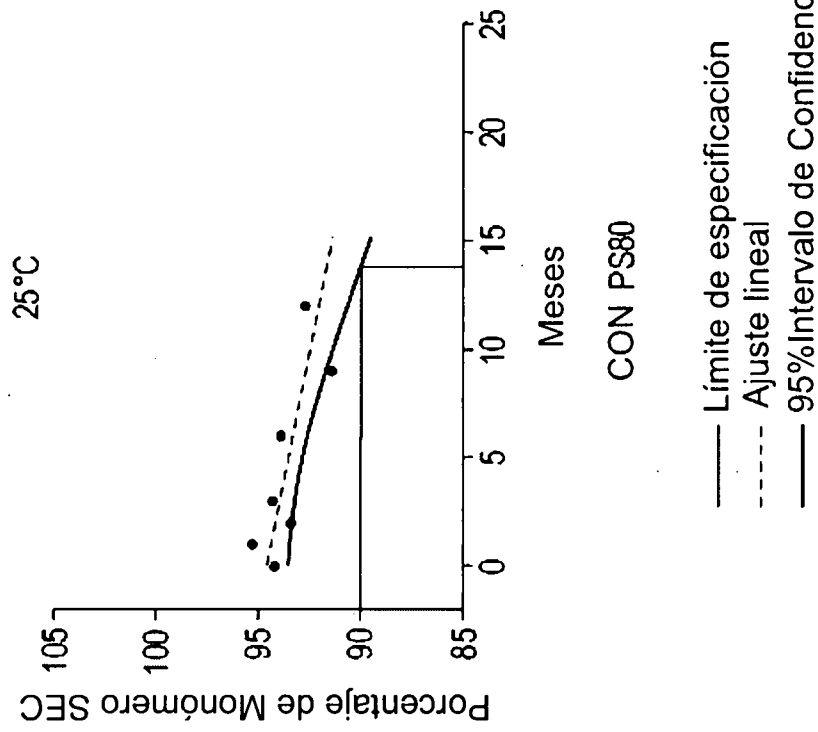


FIG. 4B

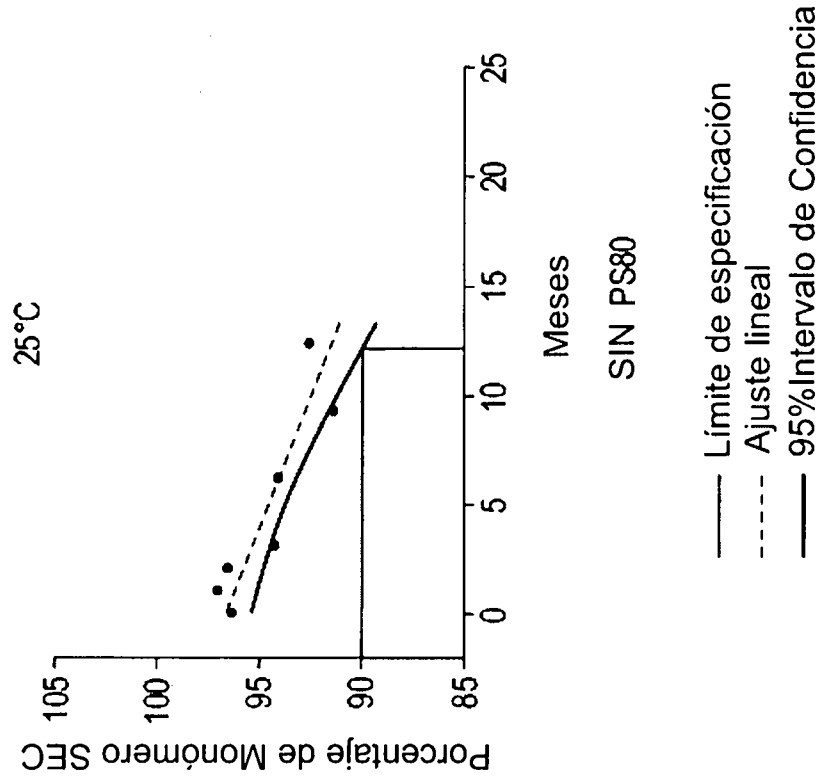


FIG. 5A

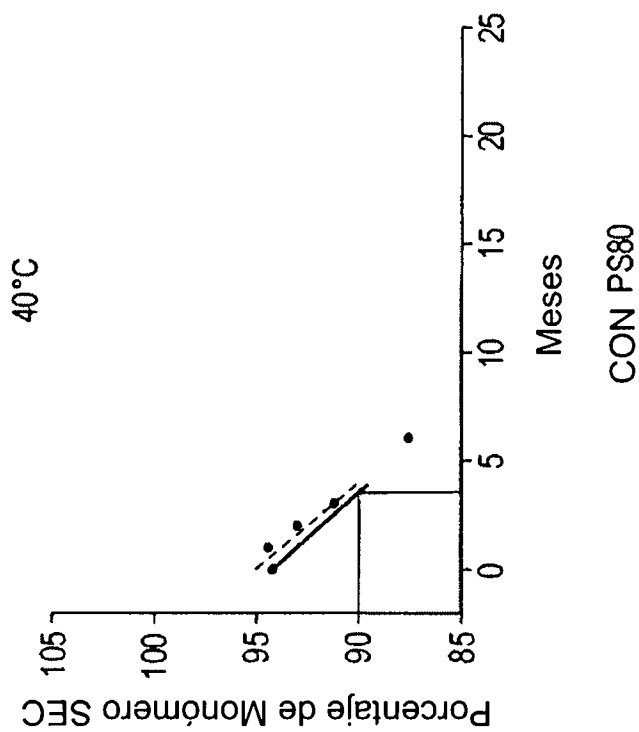
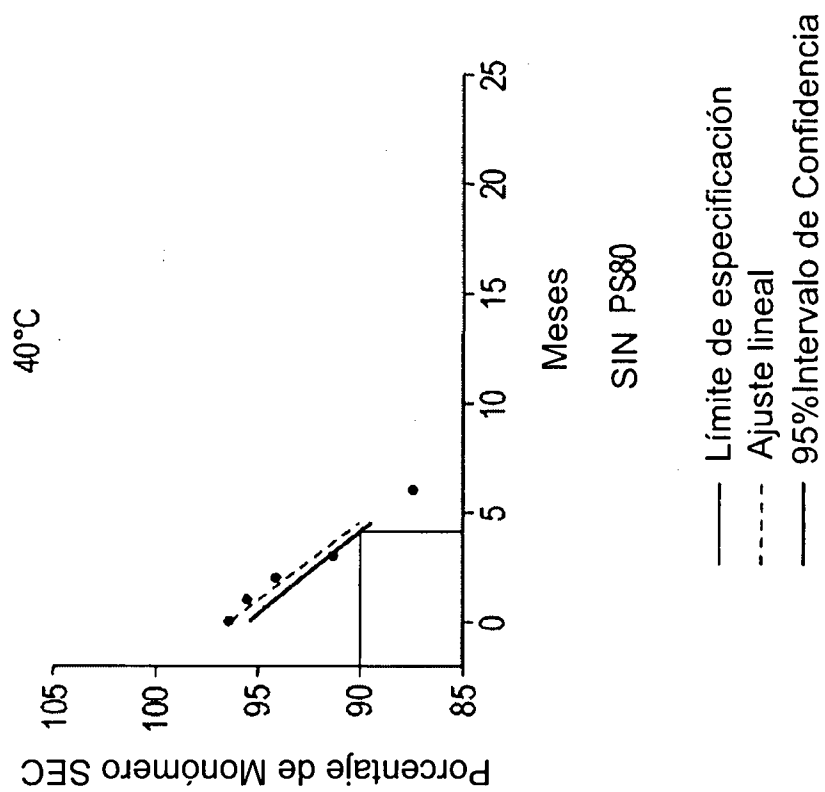


FIG. 5B



# FIG. 6

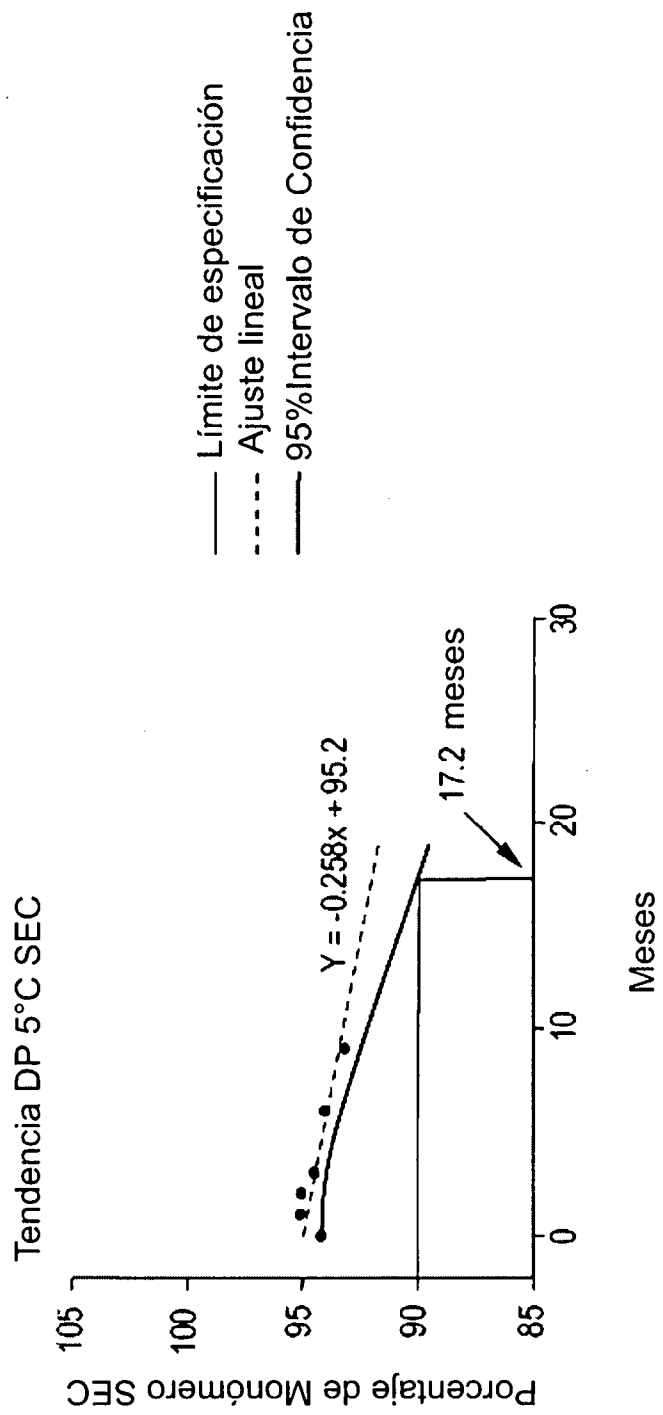


FIG. 7A

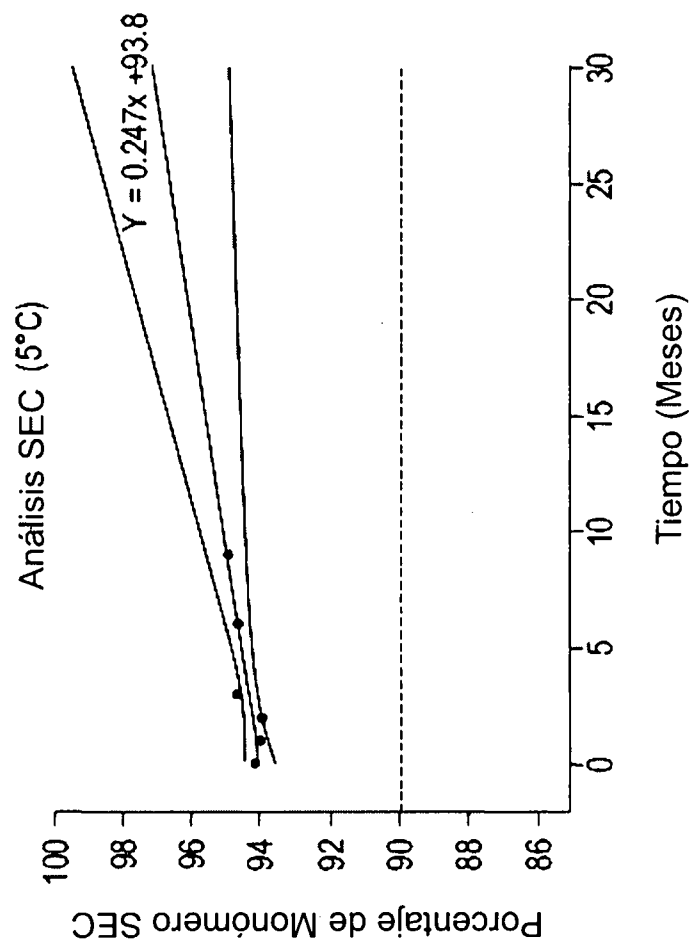


FIG. 7B

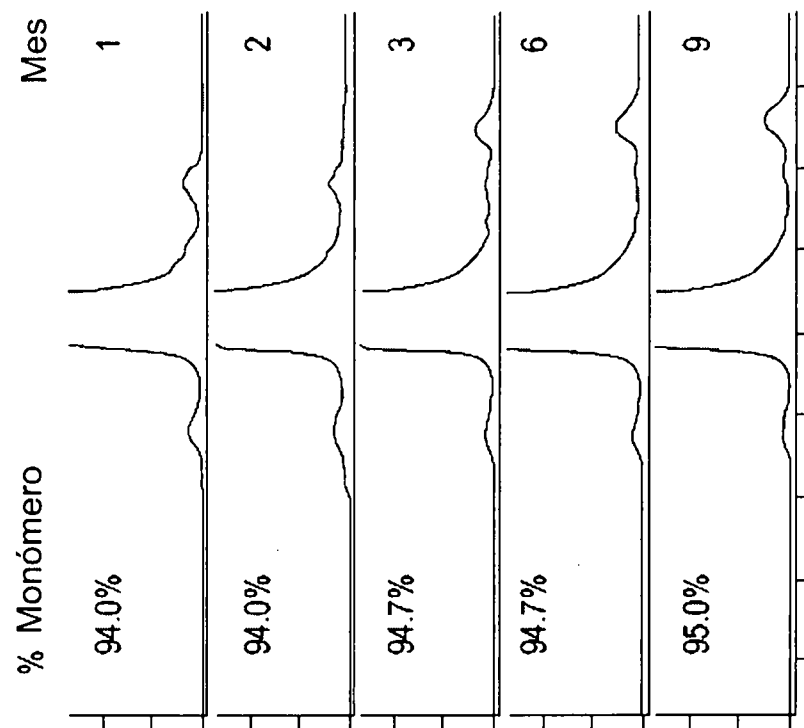
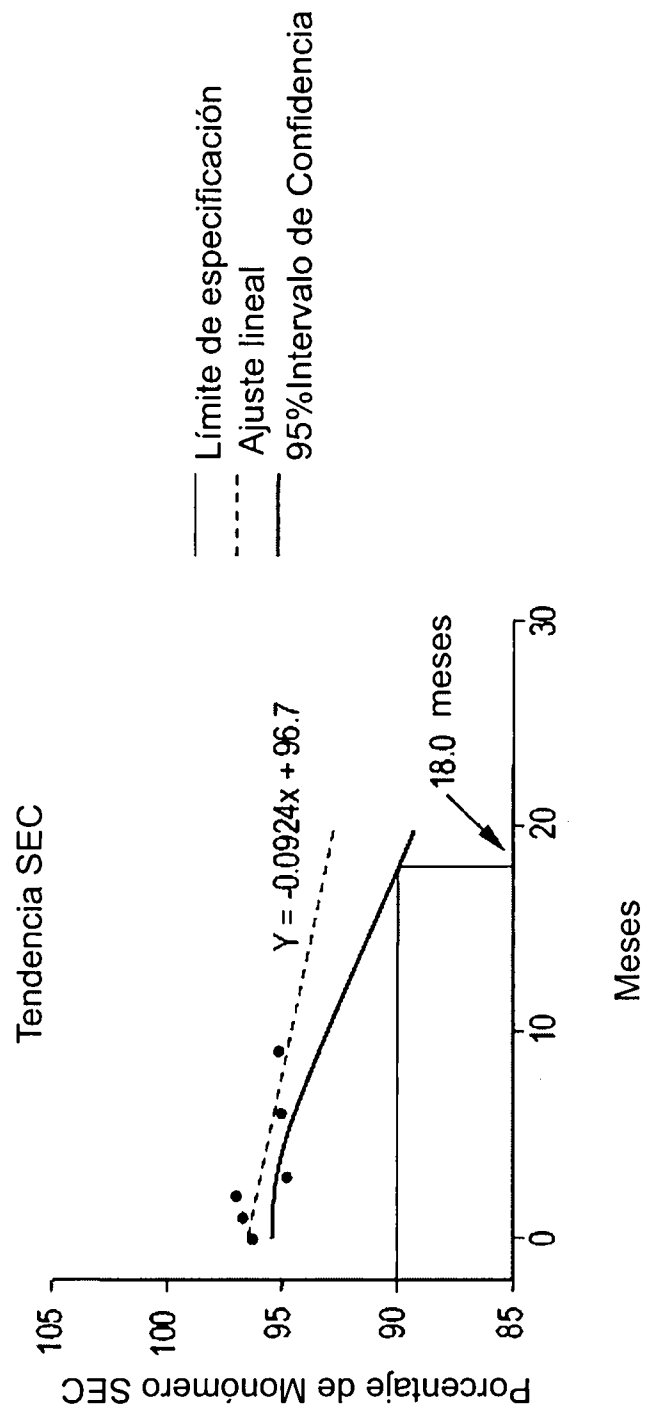
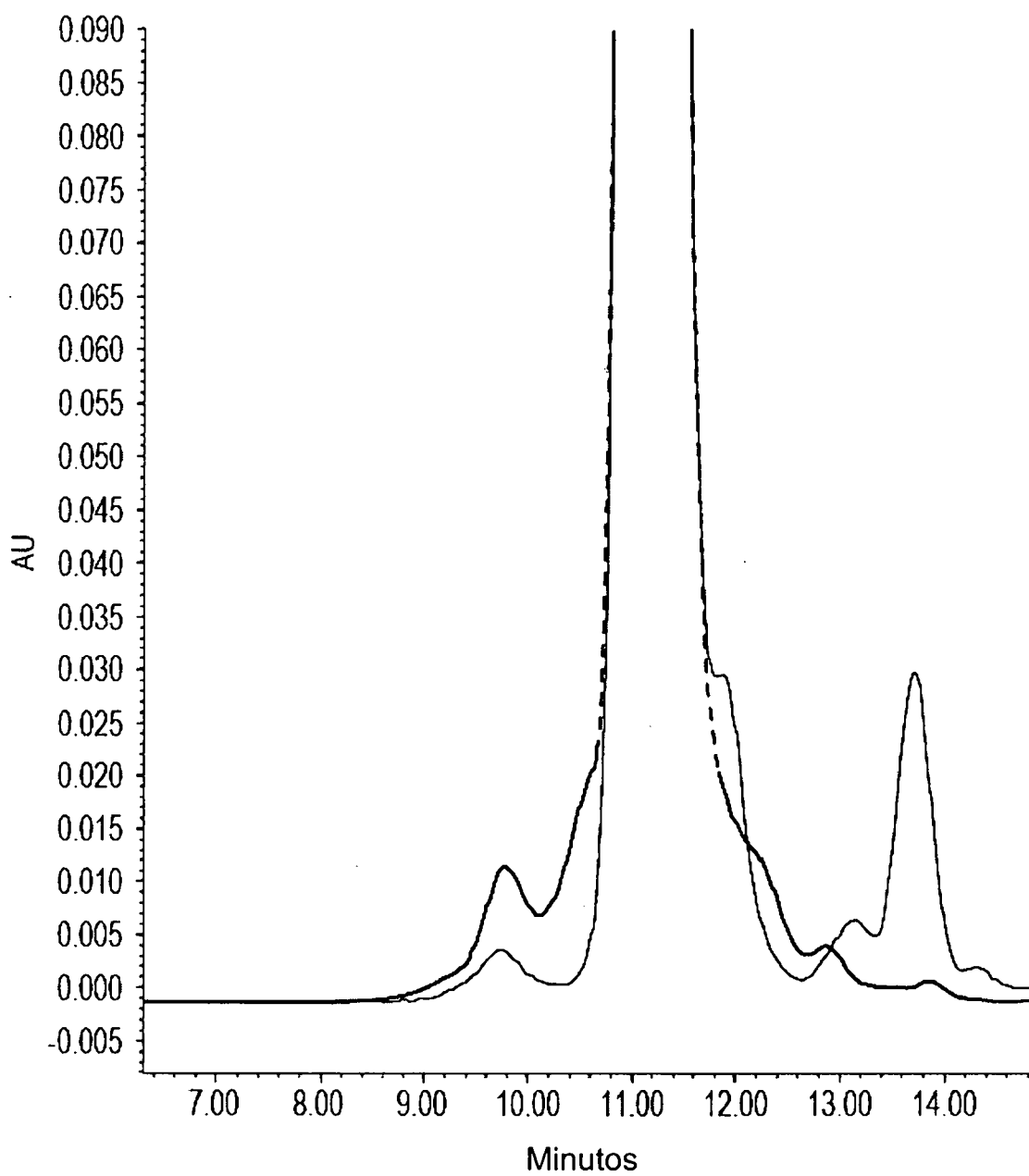


FIG. 8



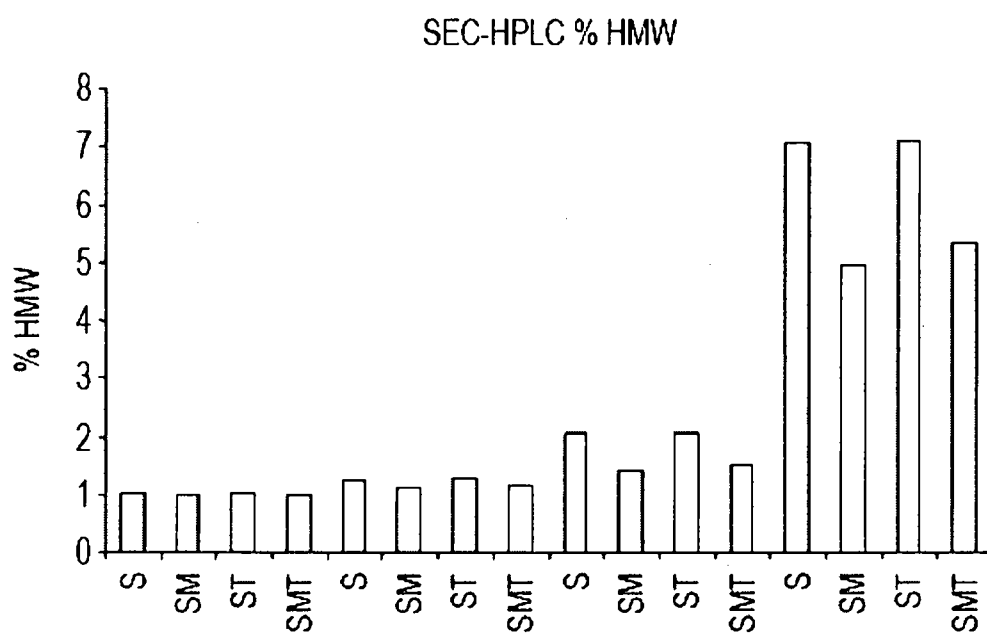
9/11

FIG. 9

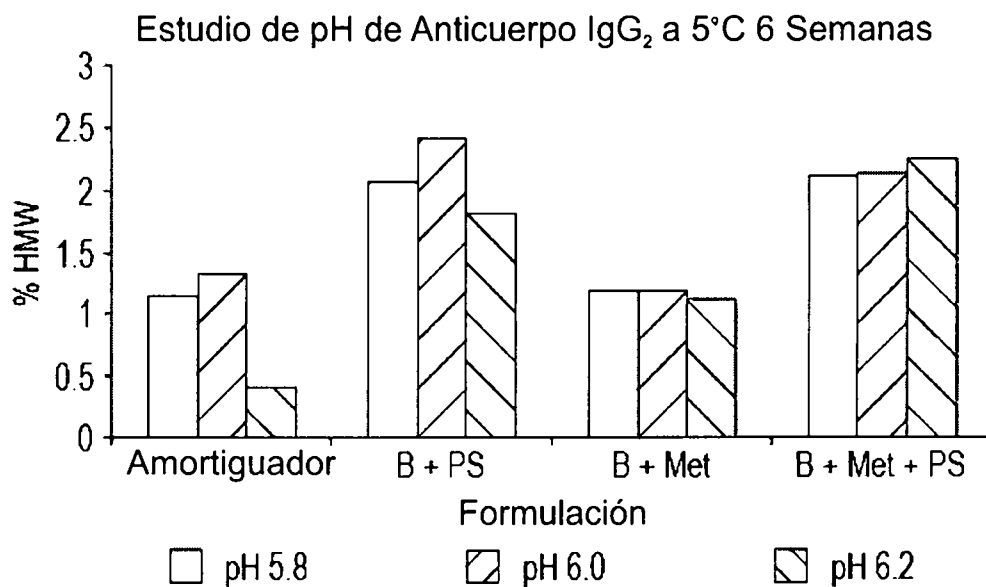
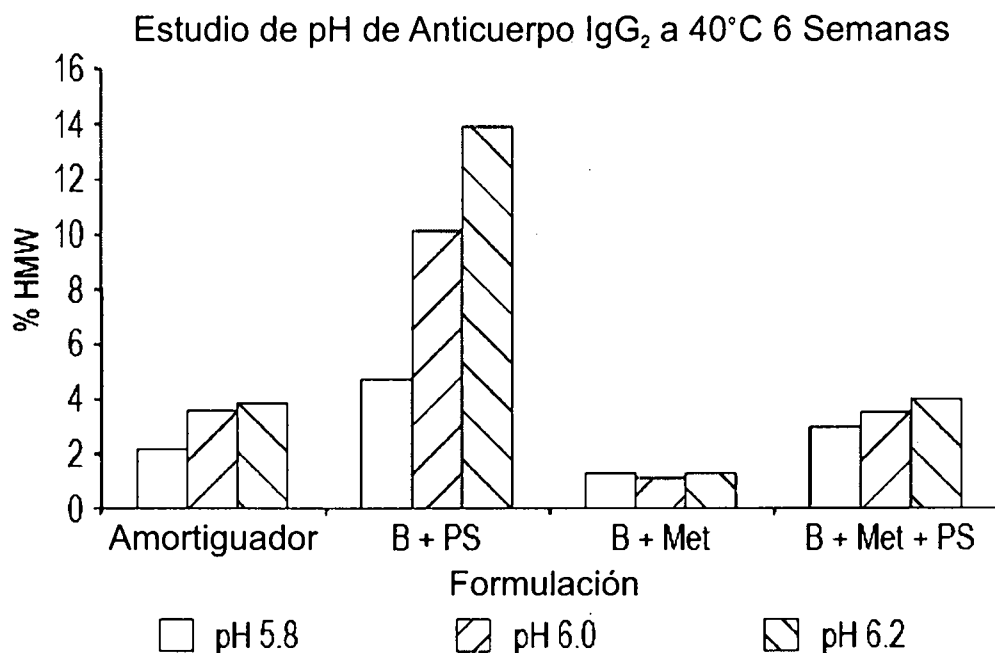


10/11

FIG. 10



S: 20 mM succinato pH 6.0  
SM: succinato + 10 mM metionina  
ST: succinato + 0.01% Ps80  
SMT: succinato + met + Ps80  
Concentración 14 mg/mL

**FIG. 11A****FIG. 11B**

Amortiguador: 10mM histidina, 150 mM NaCl

B+PS: 10mM histidina, 150 mM NaCl, 0.01% PS80

B+Met: 10mM histidina, 150 mM NaCl, 10 mM metionina

B+Me+PS: 10mM histidina, 150 mM NaCl, 10 mM metionina, 0.01% Ps80

Concentración 1 mg/mL

## LISTA DE SECUENCIA

<110> Wyeth et al.

<120> FORMULACIONES DE POLIPÉPTIDO LÍQUIDAS ESTABILIZADAS

<130> AHN-072PC

<150> 60/648639

<151> 2005-01-28

<160> 2

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Val | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Thr | Pro | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Lys | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Leu | Asp | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Asp | Gly | Lys | Thr | Tyr | Leu | Asn | Trp | Leu | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser |
|     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Pro | Gln | Arg | Leu | Ile | Tyr | Leu | Val | Ser | Lys | Leu | Asp | Ser | Gly | Val | Pro |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Trp | Gln | Gly |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |
| Thr | His | Phe | Pro | Arg | Thr | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Arg | Thr | Val | Ala | Ala | Pro | Ser | Val | Phe | Ile | Phe | Pro | Pro | Ser | Asp | Glu |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gln | Leu | Lys | Ser | Gly | Thr | Ala | Ser | Val | Val | Cys | Leu | Leu | Asn | Asn | Phe |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Tyr | Pro | Arg | Glu | Ala | Lys | Val | Gln | Trp | Lys | Val | Asp | Asn | Ala | Leu | Gln |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ser | Gly | Asn | Ser | Gln | Glu | Ser | Val | Thr | Glu | Gln | Asp | Ser | Lys | Asp | Ser |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Thr | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Thr | Leu | Thr | Leu | Ser | Lys | Ala | Asp | Tyr | Glu |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Lys | His | Lys | Val | Tyr | Ala | Cys | Glu | Val | Thr | His | Gln | Gly | Leu | Ser | Ser |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Pro | Val | Thr | Lys | Ser | Phe | Asn | Arg | Gly | Glu | Cys |     |     |     |     |     |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 2

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

&lt;400&gt; 2

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

# PATENT COOPERATION TREATY

0021

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

## PCT

To:

LAHIVE & COCKFIELD, LLP  
Attn: Milasincic, Debra J.  
28 State Street  
Boston, Massachusetts 02109  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

### Docketed

Oct 11, 2006 - Consider Article 19 Amendments.

Nov. 22, 2006 - 5 day notice re: written opin.

Nov. 27, 2006 - Answer to written opinion &  
File Demand for Int'l. Prel. Exm.

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)

11/08/2006

Applicant's or agent's file reference

AHN-072PC

**FOR FURTHER ACTION**

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2006/004741

International filing date  
(day/month/year)

27/01/2006

Applicant

WYETH

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) 338.82.70

**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 International Searching Authority

 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Catriona Cleere

RETRIEVED

FORWARDED

(See notes on accompanying sheet)

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

## INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

### What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

### When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

### Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

### How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

**The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.**

### What documents must/may accompany the amendments?

#### Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

**The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.**

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

|                                                    |                                                                                                  |                                                         |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br>AHN-072PC | <b>FOR FURTHER ACTION</b><br>see Form PCT/ISA/220<br>as well as, where applicable, item 5 below. |                                                         |
| International application No.<br>PCT/US2006/004741 | International filing date (day/month/year)<br>27/01/2006                                         | (Earliest) Priority Date (day/month/year)<br>28/01/2005 |
| Applicant<br><br>WYETH                             |                                                                                                  |                                                         |

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 5 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  
☐ a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 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/US2006/004741

100217

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
  - a. type of material
    - ☒ a sequence listing
    - ☐ table(s) related to the sequence listing
  - b. format of material
    - ☒ on paper
    - ☒ in electronic form
  - c. time of filing/furnishing
    - ☒ contained in the international application as filed
    - ☒ filed together with the international application in electronic form
    - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. **00013**  
PCT/US2006/004741

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/395 C07K16/18

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                     | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | <p>US 2004/197324 A1 (LIU JUN ET AL)<br/>7 October 2004 (2004-10-07)<br/>paragraph [0012] - paragraph [0013]<br/>paragraph [0015]<br/>paragraph [0036]<br/>paragraph [0050]<br/>paragraph [0203]</p> <p style="text-align: center;">-----<br/>-/--</p> | 1-99                  |

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

☒ See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 August 2006

Date of mailing of the international search report

11/08/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Irion, A

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | <p>WO 03/105894 A (MEDIMMUNE, INC; OLIVER, CYNTHIA, N; SHANE, ERICA; ISSAACS, BENJAMIN, S) 24 December 2003 (2003-12-24)</p> <p>page 6, line 28 - line 29<br/> page 4, line 31 - page 5, line 3<br/> page 21, line 15 - line 23<br/> page 8, line 3 - line 21<br/> page 20, line 16 - line 32<br/> page 7, line 16 - line 29<br/> page 12, line 24 - line 30<br/> page 29, line 27 - page 30, line 29</p> | 1-99                  |
| X         | <p>WO 2004/055164 A (ABGENIX INC [US]; CHEN BEI [US]; ZAPATA GERARDO [US]; MULKERRIN MICHAEL) 1 July 2004 (2004-07-01)</p> <p>paragraph [0008] - paragraph [0013]<br/> paragraph [0018] - paragraph [0019]<br/> paragraph [0038] - paragraph [0040]<br/> paragraph [0043]<br/> paragraph [0041]<br/> page 10; table 1a<br/> page 19; table 4</p>                                                          | 1-99                  |
| X         | <p>WO 03/039485 A (PROTEIN DESIGN LABS; KAISHEVA, ELIZABET, A; GUPTA, SUPRIYA; DUVUR, SHA) 15 May 2003 (2003-05-15)</p> <p>abstract<br/> page 11, line 8 - page 12, line 18<br/> page 21, line 1 - line 10</p>                                                                                                                                                                                            | 1-99                  |
| X         | <p>WO 98/56418 A (GENENTECH, INC)<br/> 17 December 1998 (1998-12-17)<br/> page 22, line 9 - page 23, line 15</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1-99                  |
| X         | <p>US 5 358 708 A (PATEL ET AL)<br/> 25 October 1994 (1994-10-25)<br/> column 2, line 19 - line 24<br/> column 3, line 59 - column 5, line 31<br/> claims 1-12</p>                                                                                                                                                                                                                                        | 1-99                  |
| X         | <p>WO 02/096457 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H; GENEN)<br/> 5 December 2002 (2002-12-05)<br/> page 4, line 13 - line 24<br/> page 8, paragraph 5 - page 9, paragraph 1<br/> page 11, paragraph 3</p>                                                                                                                                                                  | 1-99                  |
| A         | <p>US 2003/165496 A1 (BASI GURIO ET AL)<br/> 4 September 2003 (2003-09-04)<br/> the whole document</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1-99                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

00020

PCT/US2006/004741

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 2004197324 A1                          | 07-10-2004          | US 2005158303 A1           | 21-07-2005          |
| WO 03105894 A                             | 24-12-2003          | AU 2003245515 A1           | 31-12-2003          |
|                                           |                     | CA 2489632 A1              | 24-12-2003          |
|                                           |                     | EP 1531862 A1              | 25-05-2005          |
|                                           |                     | JP 2006501168 T            | 12-01-2006          |
| WO 2004055164 A                           | 01-07-2004          | AU 2003293543 A1           | 09-07-2004          |
| WO 03039485 A                             | 15-05-2003          | CA 2466034 A1              | 15-05-2003          |
|                                           |                     | CN 1612689 A               | 04-05-2005          |
|                                           |                     | EP 1441589 A2              | 04-08-2004          |
|                                           |                     | JP 2005508981 T            | 07-04-2005          |
| WO 9856418 A                              | 17-12-1998          | AT 230277 T                | 15-01-2003          |
|                                           |                     | AU 740284 B2               | 01-11-2001          |
|                                           |                     | AU 8255998 A               | 30-12-1998          |
|                                           |                     | CA 2292730 A1              | 17-12-1998          |
|                                           |                     | DE 69810481 D1             | 06-02-2003          |
|                                           |                     | DE 69810481 T2             | 25-09-2003          |
|                                           |                     | DK 999853 T3               | 22-04-2003          |
|                                           |                     | EP 0999853 A1              | 17-05-2000          |
|                                           |                     | ES 2190087 T3              | 16-07-2003          |
|                                           |                     | JP 2002504907 T            | 12-02-2002          |
| US 5358708 A                              | 25-10-1994          | NONE                       |                     |
| WO 02096457 A                             | 05-12-2002          | BR 0209777 A               | 01-06-2004          |
|                                           |                     | CA 2448345 A1              | 05-12-2002          |
|                                           |                     | CN 1537015 A               | 13-10-2004          |
|                                           |                     | EP 1397159 A2              | 17-03-2004          |
|                                           |                     | JP 2004532262 T            | 21-10-2004          |
|                                           |                     | US 2006127395 A1           | 15-06-2006          |
|                                           |                     | US 2004170623 A1           | 02-09-2004          |
| US 2003165496 A1                          | 04-09-2003          | US 2004087777 A1           | 06-05-2004          |

From the  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY  
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing

(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference

see form PCT/ISA/220

**FOR FURTHER ACTION**

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US2006/004741

International filing date (day/month/year)

27.01.2006

Priority date (day/month/year)

28.01.2005

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

INV. A61K39/395 C07K16/18

Applicant

WYETH

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 usually 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:



European Patent Office  
D-80298 Munich  
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of  
this opinion

see form  
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Irion, A

Telephone No. +49 89 2399-8174



**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

100002  
International application No.  
PCT/US2006/004741

---

**Box No. I Basis of the 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
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) 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:
    - ☒ on paper
    - ☒ in electronic form
  - c. time of filing/furnishing:
    - ☒ contained in the international application as filed.
    - ☒ filed together with the international application in electronic 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/US2006/004741

**Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 8,13,62 (each in part)

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 8,13,62 (each partial)

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE  
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

80992  
International application No.  
PCT/US2006/004741

---

**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**

---

**1. Statement**

|                               |             |              |
|-------------------------------|-------------|--------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | 9, 10, 67-99 |
|                               | No: Claims  | 1-8, 11-66   |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims |              |
|                               | No: Claims  | 1-99         |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | 1-99         |
|                               | No: Claims  |              |

**2. Citations and explanations**

**see separate sheet**

## **Item III**

### **III.1 With respect to claim 8 and 62**

The term "analog thereof" used in claims 8 and 62 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear, Article 6 PCT.

### **III.2 With respect to claim 13**

The term "tonicity agent" used in claim 13 is unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claim unclear, Article 6 PCT. Compounds mentioned in the application being such a tonicity agent are  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ , lactose, sorbitol, sucrose, mannitol, trehalose, raffinose, polyethylene glycol, hydroxyethyl starch, and glycine (p. 37 l. 29-32). Therefore, the examination of claim 13, and any claim being dependent on claim 13 without further specifying the nature of said tonicity agent, is restricted to agents being explicitly mentioned in the application.

## **Item V**

### **V.1 Reference is made to following documents**

- D1: US2004/0197324 (J. LIU & S.J. SHIRE) 07 October 2004 (2004-10-07)
- D2: WO03105894 (MEDIMMUNE, INC) 24 December 2003 (2003-12-24)
- D3: WO2004/055164 (ABGENIX, INC) 01 July 2004 (2004-07-01)
- D4: WO03039485 (PROTEIN DESIGN LABS, INC) 15 May 2003 (2003-05-15)
- D5: WO9856418 (GENENTECH, INC.) 17 December 1998 (1998-12-17)
- D6: US5358708 (S.T. PATEL) 25 October 1994 (1994-10-25)
- D7: WO02096457 (NOVARTIS AG) 05 December 2002 (2002-12-05)
- D8: US2003165496 (G. BASI ET AL.) 04 September 2003 (2003-09-04)

### **V.2 Novelty (Article 33(2) PCT)**

#### **V.2.1 Prior art documents**

Document D1 describes a stable highly concentrated liquid antibody formulation comprising 100 mg/ml or more antibody (e.g. 100-260 mg/ml, 40-150 mg/ml), 10-100

mM **histidine**, 20-350 mM trehalose or sucrose and 0.01%-0.1% polysorbate (paragraph [0012]-[0013]). Pharmaceutical formulations are described which are delivered subcutaneously (paragraph [0015]). The formulation may comprise any antibody subclass, i.e. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 and IgA2 (paragraph [0036]), or chimeric or humanized antibodies (paragraph [0050]). The definition of "stable" is given in paragraph [0063]. Furthermore, an **antioxidant**, such as **methionine** or ascorbic acid, may be included (paragraph [0203]).

Document D2 describes a stabilized liquid anti-RSV antibody formulation comprising histidine and 15 mg/ml or more antibody (p. 6 l. 28-29). D2 further describes a lyophilized formulation comprising after reconstitution 100 mg/ml antibody, 50 mM **histidine** and 3.2 mM glycine buffer with **6% (w/v) mannitol** (p. 4 l. 31 - p. 5 l. 3). The liquid antibody formulation may further comprise **methionine** (p. 6 l. 32), **mannitol** or sorbitol, sucrose and polysorbate (p. 21 l. 15-23). Antibody and histidine concentration of the formulation is given on p. 8 l. 3-21 and p. 20 l. 16-32. A definition of "stable" is given on p. 7 l. 16-29. Tonicity adjusting compounds such as NaCl, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> are further used (p. 12 l. 24-30). The method of preparing the antibody formulations is disclosed (p. 29 l. 27- p. 30 l. 21). The liquid formulations are prepared as unit dosage forms (p. 30 l. 22-29).

Document D3 describes a solid and a liquid antibody formulation comprising e.g. IgG2 antibodies, **histidine** (6-40 mM, 15 mM) and at least one of **mannitol** (0.175 or 0.325%), polysorbate 80, succinate, an amino acid, sucrose, lactose and sorbitol (paragraph [0008]-[0013], [0018]-[0019], [0038]-[0040], [0043], p. 10 Table 1A, p. 19 Table 4). Stabilized formulations can include less than 2% aggregation as determined by SEC-HPLC (paragraph [0041]).

Document D4 describes a stable liquid formulation comprising IgG antibodies (50 mg/ml or more), 20-60 mM succinate buffer or 30-70 mM **histidine** buffer, 0.01-0.1% polysorbate 80 and 75-150 mM NaCl (abstract, p. 11 l. 8 - p. 12 l. 18). When histidine is used as buffering agent, then an **antioxidant** has to be included (p. 11 l. 18). The antibody formulation is stable at 2-8°C for 2 years and is suitable for s.c. administration. D4 further mentions that **100 mM methionine** in a antibody formulation buffered by Na-succinate or Na-phosphate does not have any stabilizing effect on the protein stability (p. 21 l. 1-10).

Document D5 describes a stabilized aqueous antibody formulation comprising a

buffer, i.e. acetate, succinate, gluconate, **histidine** or citrate (1-50 mM, 5-30 mM), a polyol, e.g. sucrose or trehalose (1-15% (w/v), 2-10% (w/v)) or a lower amount of **mannitol** may be added instead of trehalose, a surfactant such as polysorbate 80 (0.001-0.5%, 0.005-0.2%, 0.01-0.1%). Said formulation may further comprise an **antioxidant**, i.e. ascorbic acid or **methionine** (p. 22 l. 9 - p. 23 l. 15).

Document D6 describes aqueous formulations of proteins, i.e. IFN, GM-CSF and interleukin, comprising **methionine** or histidine as stabilizers (col. 2 l. 19-24, col. 3 l. 59 - col. 5 l. 31, claims 1-12).

Document D7 describes stable liquid antibody formulations comprising high antibody concentration (at least 50, 80, 100, 140, 160, 180, 200, 220, 250, 300 mg/ml) (p. 4 l. 13-24). Furthermore, the antibody formulation comprises an acidic component, e.g. acetate buffer, CaCl<sub>2</sub> and/or MgCl<sub>2</sub>, a detergent, e.g. polysorbate 80 and/or sugar, e.g. **mannitol**, and **antioxidants**, e.g. ascorbic acid and **methionine** (p. 8 5th paragraph - p. 9 1st paragraph, p. 11 3rd paragraph).

Document D8 is cited as an example of the numerous documents of the art disclosing anti-Abeta antibodies as mentioned in the present application on p. 15 l. 1-13 or on p. 36 l. 29 - p. 40 l. 29. It appears that most of the antibodies mentioned are comprised in the art.

#### **V.2.2 With respect to claims 1-8 and 11-66**

In the light of the prior art, the subject-matter of claims 1-8 and 11-66 is not considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

#### **V.2.3 With respect to claims 9, 10, 67-99**

None of the documents cited above disclose an antibody formulation as defined in claims 9, 10, 67-99. Therefore, the subject-matter of claims 9, 10, 67-99 is considered novel in the sense of Article 33(2) PCT.

### **V.3 Inventive step (Article 33(3) PCT)**

#### **V.3.1 With respect to claims 9, 10, 67-99**

The subject-matter of claims 9, 10, 67-99 differs from the cited prior art in that the amount of those compounds comprised in an antibody formulation being responsible for the stabilization of said antibody is different. The technical problem to be solved

may be regarded as providing an alternative stabilized liquid antibody formulation. The determination of specific concentration of the compounds known to have stabilizing effects falls under the routine experimental work of the skilled person. Furthermore, a surprising effect based on the specific formulation is not apparent. Therefore, the subject-matter of claims 9, 10, 67-99 is not considered inventive in the sense of Article 33(3) PCT.

#### **V.4 Industrial applicability (Article 33(4) PCT)**

##### **V.4.1 With respect to claims 1-99**

The subject-matter of claims 1-99 appears to be susceptible of industrial application.

#### **V.5 Further remarks**

##### **V.5.1 With respect to claims 9, 10, 20-23, 25-28, 30, 31, 34-38, 40-46, 49-53, 67-77, 79-97**

The term "about" used in claims 9, 10, 20-23, 25-28, 30, 31, 34-38, 40-46, 49-53, 67-77, 79-97 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claims unclear (Article 6 PCT).

##### **V.5.2 With respect to claim 12**

The expression "the formulation is capable of traversing the blood-brain-barrier" used in claim 12 is unclear, since the formulation as a whole does not appear to traverse the BBB, rather the antibody alone.

##### **V.5.3 With respect to claim 24**

The expression "mannitol is present in amount sufficient to maintain isotonicity of the formulation" used in claim 24 is unclear. The claim attempts to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result.

##### **V.5.4 With respect to claim 29**

The expression "histidine is present in amount sufficient to maintain a physiologically

suitable pH" used in claim 29 is unclear. The claim attempts to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result.

**V.5.5 With respect to claims 1 and 59**

The expression "an anti-oxidant in an amount sufficient to reduce the amount of by-product formation of the polypeptide" used in claims 1 and 59 is unclear. Said claims attempt to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result.

00000

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

MILASINCIC, Debra, J.  
LAHIVE & COCKFIELD, LLP  
28 State Street  
Boston, Massachusetts 02109  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

|                                                                      |                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>05 June 2006 (05.06.2006)        |                                                                            |
| Applicant's or agent's file reference<br>AHN-072PC                   | IMPORTANT NOTIFICATION                                                     |
| International application No.<br>PCT/US2006/004741                   | International filing date (day/month/year)<br>27 January 2006 (27.01.2006) |
| International publication date (day/month/year)<br>Not yet published | Priority date (day/month/year)<br>28 January 2005 (28.01.2005)             |
| Applicant<br>WYETH et al                                             |                                                                            |

1. 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).

2. *(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.

3. *(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 the 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.

| <u>Priority date</u>         | <u>Priority application No.</u> | <u>Country or regional Office<br/>or PCT receiving Office</u> | <u>Date of receipt<br/>of priority document</u> |
|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 28 January 2005 (28.01.2005) | 60/648,639                      | US                                                            | 03 May 2006 (03.05.2006)                        |

|                                                                                               |                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br><br>Nora Lindner                           |
| Facsimile No. +41 22 338 82 70                                                                | Facsimile No. +41 22 338 89 65<br>Telephone No. +41 22 338 97 20 |

|                                                                                                                                      |                                                       |                                                                                                                                                               |                                |                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA |                                                       | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN<br>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT |                                | 00231                                                                        |
| (21) N° de solicitud:                                                                                                                |                                                       | (51) Int Cl: A61K 39/395, C07K 16/18                                                                                                                          |                                |                                                                              |
| 22) Fecha de solicitud:                                                                                                              |                                                       | (71) Solicitante(s) WYETH                                                                                                                                     |                                |                                                                              |
| (30) Prioridad                                                                                                                       | (31) No.<br>60/648,639                                | 32) Fecha<br>28/01/05                                                                                                                                         | (33) Pais<br>US                | (72) Inventor(es) LUISI, Donna., y<br>WARNE, Nicholas W. y<br>KANTOR, Angela |
|                                                                                                                                      |                                                       | (74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ                                                                                                                         |                                |                                                                              |
| (85)                                                                                                                                 | Fecha limite inicio fase nacional: 28/08/07           |                                                                                                                                                               | (87) Publicación internacional |                                                                              |
| (86)                                                                                                                                 | Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT |                                                                                                                                                               | Fecha: 03/08/06                |                                                                              |
|                                                                                                                                      | Fecha de presentación de la solicitud: 27/01/06       |                                                                                                                                                               | N° publicación: WO/2006/081587 |                                                                              |
|                                                                                                                                      | No. de solicitud PCT/US2006/004741                    |                                                                                                                                                               |                                |                                                                              |
| (54) Título: FORMULACIONES DE POLIPÉPTIDO LÍQUIDAS ESTABILIZADAS                                                                     |                                                       |                                                                                                                                                               |                                |                                                                              |

Reivindicación(es):

1. Una formulación líquida que comprende,
- un polipéptido de unión de antígeno terapéuticamente activo, en donde el polipéptido exhibe formación de subproducto durante el almacenamiento, y
- un antioxidante, en donde dicho antioxidante está presente en una cantidad suficiente para reducir la formación de subproducto del polipéptido durante el almacenamiento de la formulación.

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE  
PCT**

**PATENTE DE INVENCION**      [ ]

**MODELO DE UTILIDAD**      [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [ ]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- ◆ Descripción de la invención [ ]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

**COMPLETA** [ ]

**INCOMPLETA** [ ]

**DISEÑO INDUSTRIAL**      [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

**COMPLETA** [ ]

**INCOMPLETA** [ ]

**ESQUEMA DE TRAZADO**      [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

**COMPLETA** [ ]

**INCOMPLETA** [ ]

**Firma Responsable**

**Fecha**

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**



**No. 07-087987- -00000-0000**

Fecha: 2007-08-28 16:30:06      Dep. 2020 NUECREACION  
Tra. 11 PATENTEIYII      Eve: 378 FASENACIONALI  
Act 411 PRESENTACION      Folios: 233

**Carretera 13, No. 27-00 Piso 5, 7 y 10**

**Conmutador: 3 82 08 40**

**Fax: 350 52 20**

**E-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co)**

**[www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co)**

**Bogotá, D.C., Colombia**

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Folio 235

2020  
Bogotá D.C.,

Doctor(a)  
CORREA ORDOÑEZ ALVARO  
Apoderado(a) y/o Representante de  
WYETH

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 7 87987           |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2006/004741 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 28/08/2007        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 416               |
|            | Oficio No.                 | 4163              |
|            | Folios                     | 1                 |

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase  
Dado en Bogotá DC,

05 OCT 2007

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

jfernand