

# OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK MOURE 8

  
**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-149371- -00000-0000

Fecha: 2009-12-30 17:43:38

País: 11 PALESTINA

Act: 411 PRESENTACION

Dep: 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 59

PETITORIO - FORMULARIO UNICO

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000222

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE**  
(71)

Nombre: GLAXOSMITHKLINE LLC

Dirección: One Franklin P  
Plaza, 200 North 16<sup>th</sup> Street Philadelphia,  
Pennsylvania 19102

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos de  
América.

Teléfono: \_\_\_\_\_

Fax: \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual \_\_\_\_\_

Número \_\_\_\_\_

**REPRESENTANTE**  
**O APODERADO**

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,  
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

**IDENTIFICACIÓN**

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual \_\_\_\_\_

Número 79782747Bta  
TP 74.295

**INVENTOR (ES)**  
(72)

Nombre: 1) Charlene, E. Brisbane 2) Amol, Sharad ketkar 3) Ulla Tove Lashmar

Dirección: 1 y 2) 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 y 3 New  
Frontiers Science Park, Third Avenue, Harlow, Essex, CM 19 5AW

Nacionalidad o Domicilio: 1 Y 2 Estadounidense y 3 Dinamarqués

5

**PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/069125

Fecha Julio 3, 2008

Publicación Internacional No. WO 2009/009407

Fecha Enero 15, 2009

6

**Título (54) FORMULACIONES DE ANTICUERPOS**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Clasificación Internacional (51) A61K 39/395**

**Prioridad**

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Julio 6, 2007

(31) Número de Solicitud

60/948,220

9

Comprobante de pago No. 09-

Fecha 30 Diciembre 2009

10

**ANEXOS**☒

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. Adjunto copia simple ver expediente No.

☒Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. *Declaración bajo la Regla 4.176(ii) del PCT.*  
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.

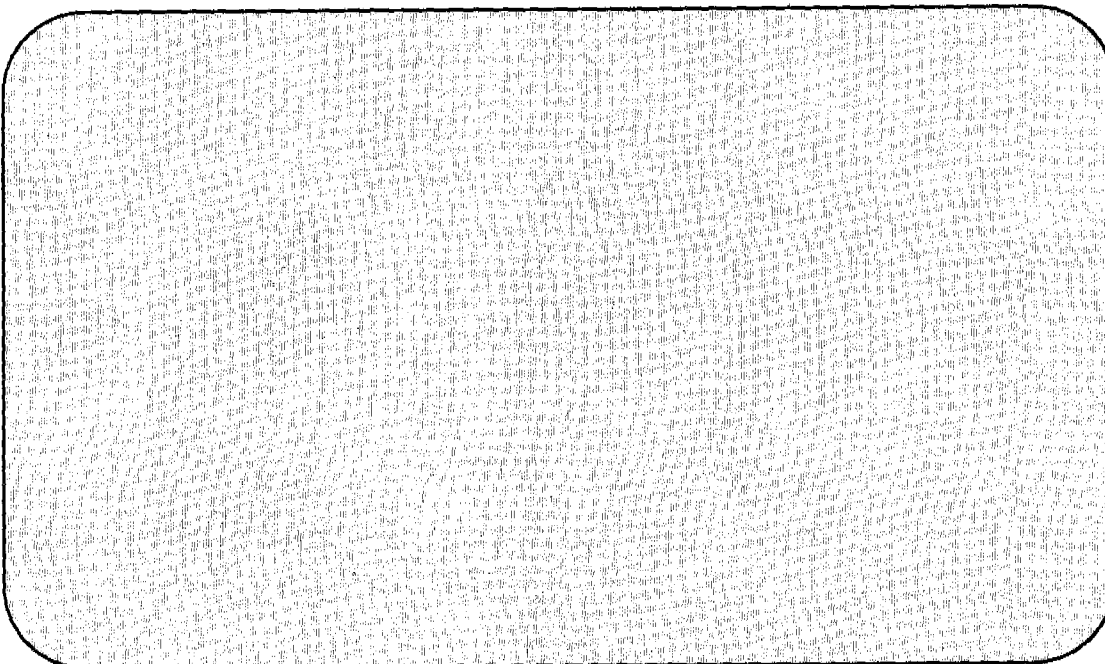
☒

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

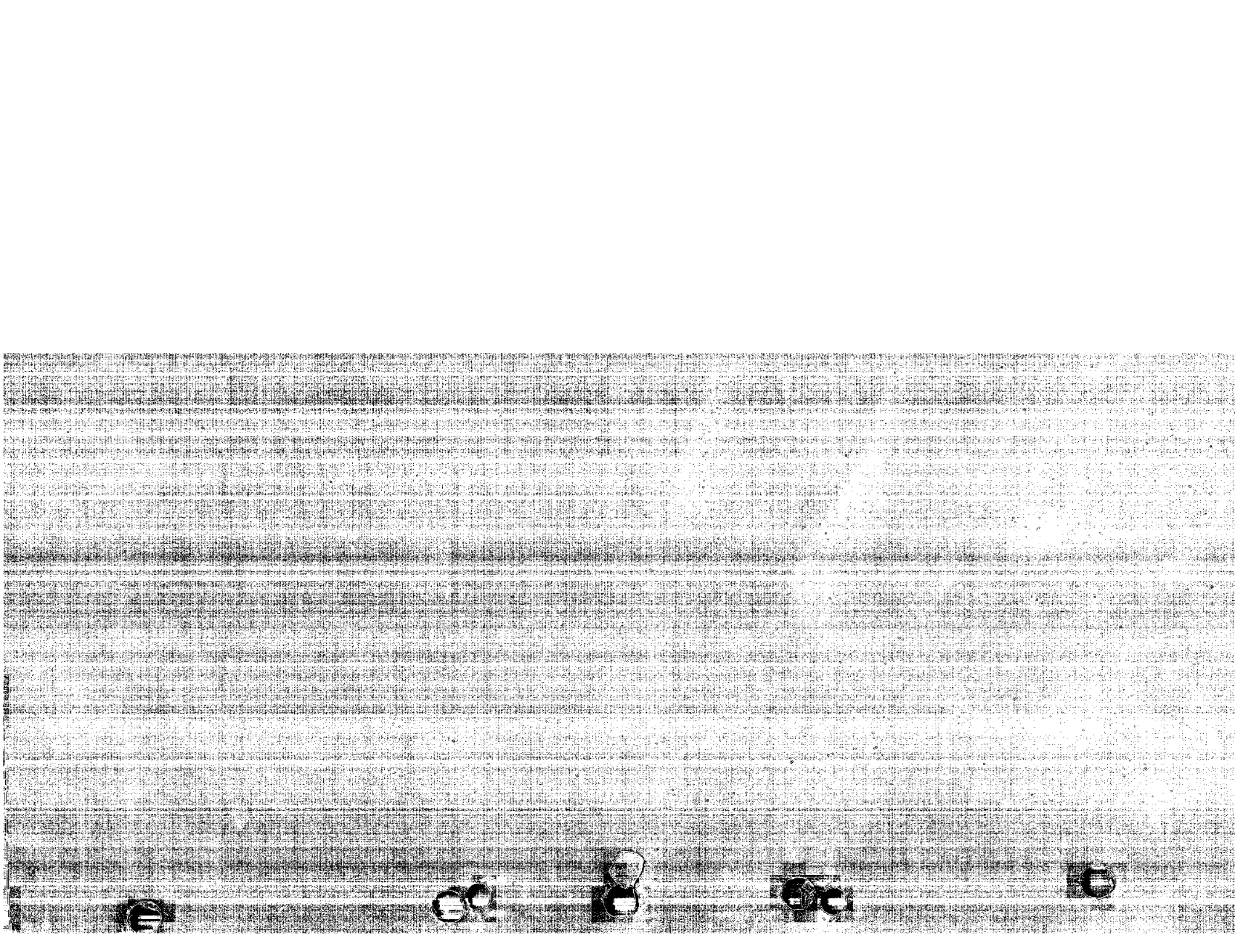
11

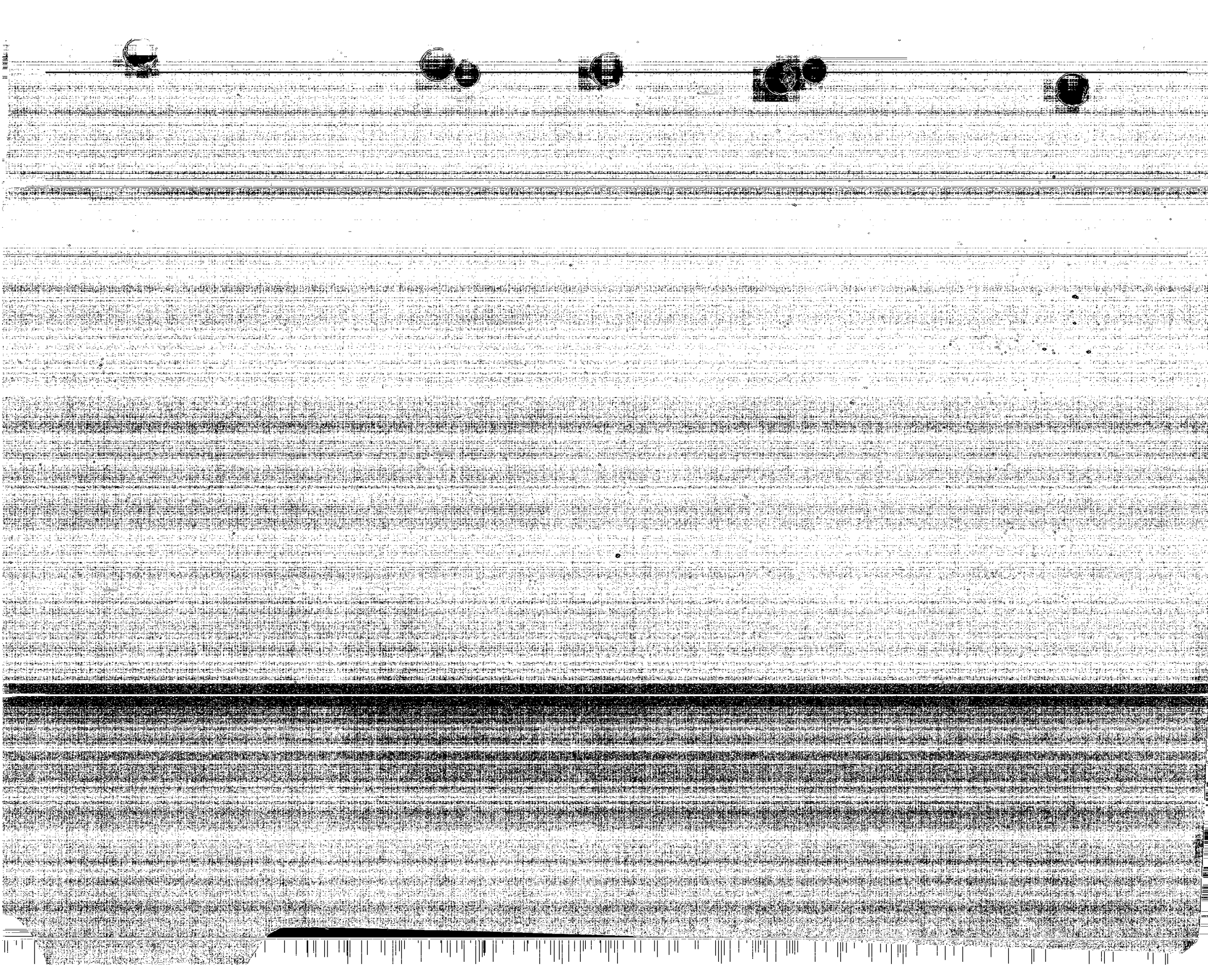
**FIGURA CARACTERÍSTICA:**

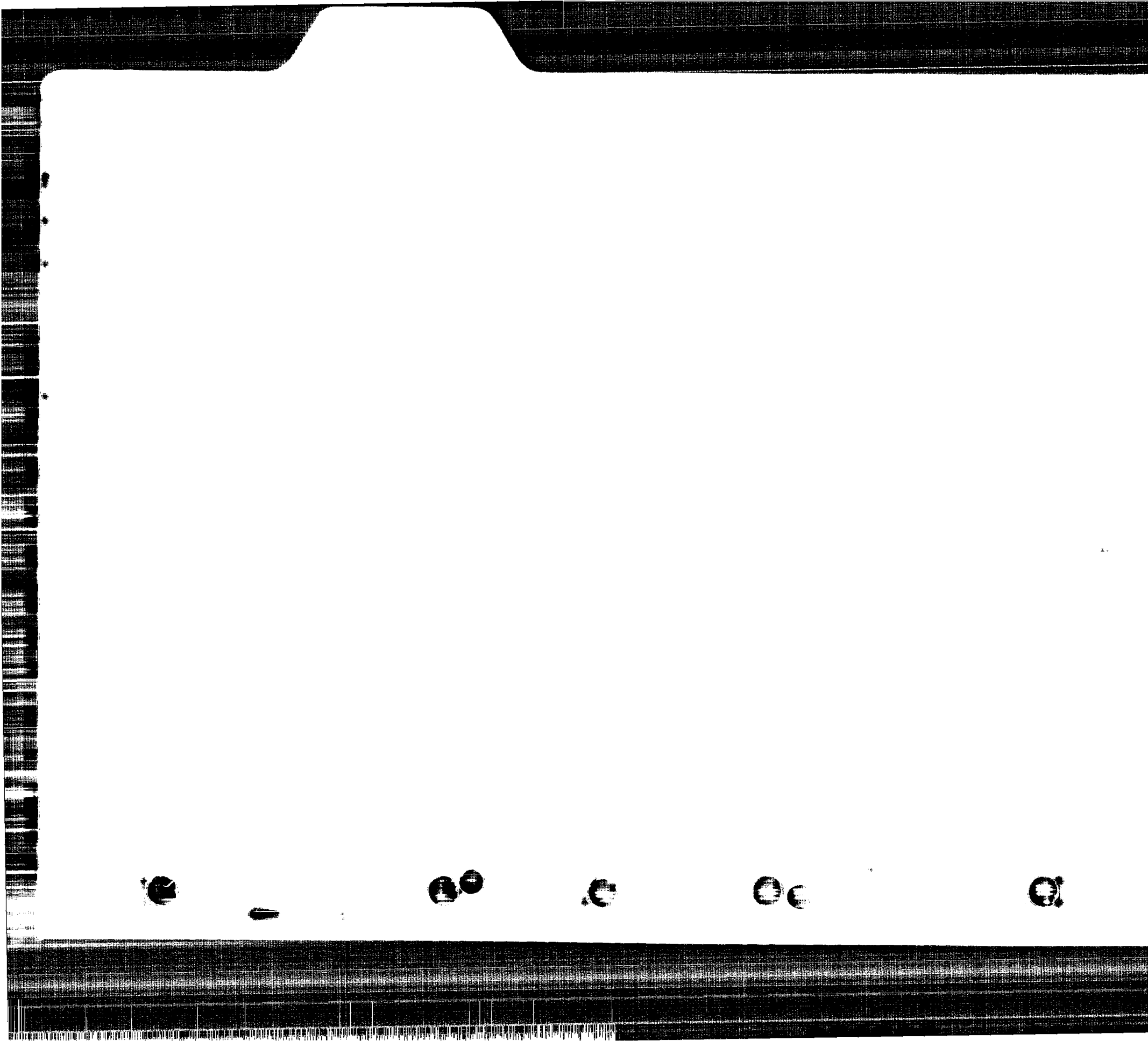
12

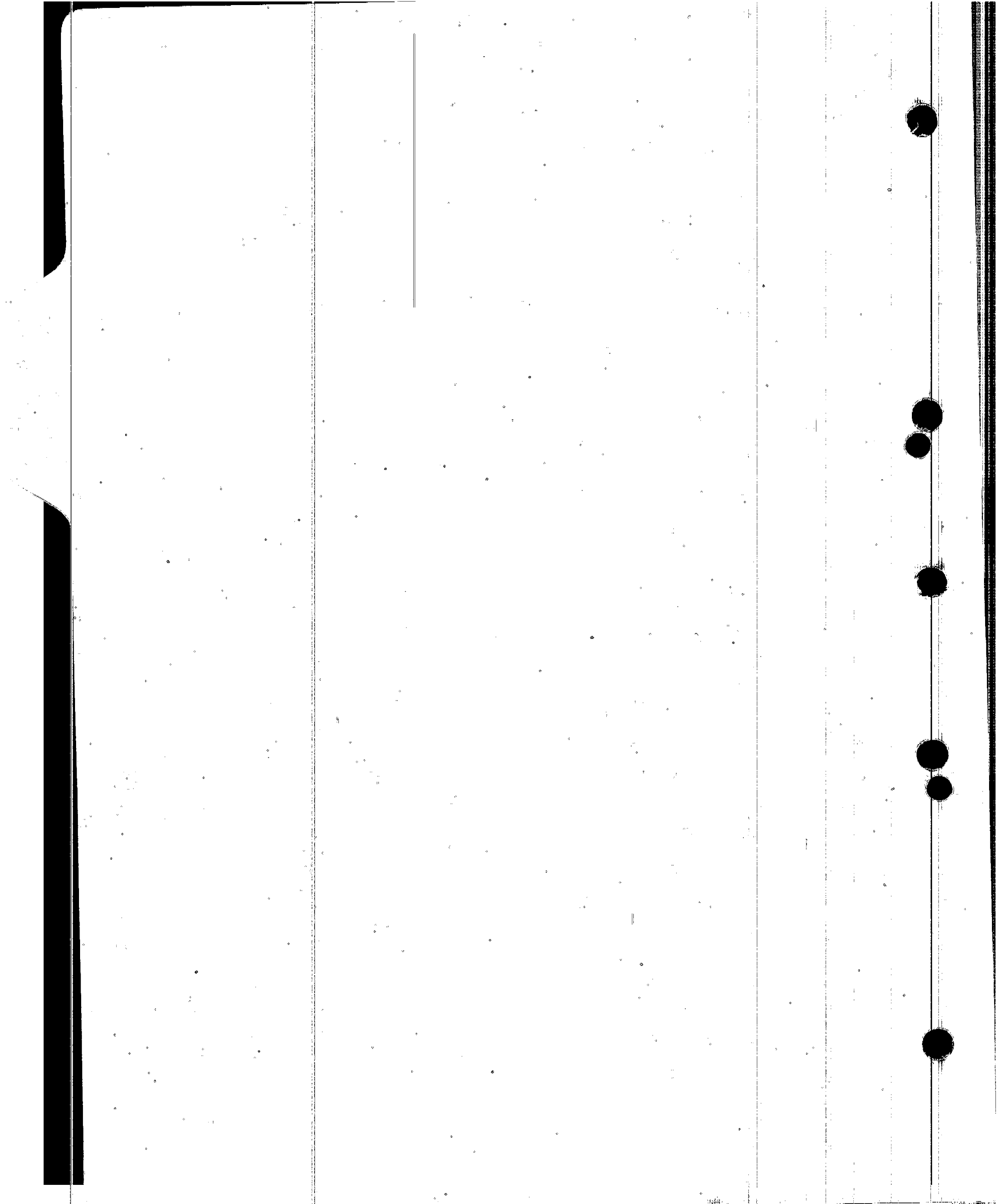
Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTEFIRMA: C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295









**Box No. VIII(ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT**

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII(i) to (v) (in general and the specific Notes to Box No. VIII(ii)). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to International Application No. PCT/US2008/069125

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from

BRISBANE, Charlene E. of 709 Swedeland Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406 to SmithKline Beecham Corporation dated 02 September 2008;

KETKAR, Amol Sharad of 709 Swedeland Road, King of Prussia, Pennsylvania 19406 to SmithKline Beecham Corporation dated 02 September 2008;

LASHMAR, Ulla Tove of New Frontiers Science Park, Third Avenue, Harlow, Essex CM19 5 AW to SmithKline Beecham Corporation dated 11 August 2008.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII(ii)".

Form PCT/RO/101 (declaration sheet (ii)) (March 2001; reprint January 2003)

See Notes to the request form





5

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
15 January 2009 (15.01.2009)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 2009/009407 A1

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

(21) International Application Number:  
PCT/US2008/069125

(22) International Filing Date: 3 July 2008 (03.07.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/948,220 6 July 2007 (06.07.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US):  
SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION  
[US/US]; One Franklin Plaza, P.O. Box 7929, Philadelphia, PA 19101 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BRISBANE, Charlene, E. [US/US]; 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 (US). KETKAR, Amol, Sharad [US/US]; 709 Swedeland Road, King of Prussia, PA 19406 (US). LASHMAR, Ulla, Tove [DK/GB]; New Frontiers Science Park, Third Avenue, Harlow, Essex, CM19 5AW (GB).

(74) Agents: DERMOTT, Jonathan, M. et al.; Glaxosmithkline, Corporate Intellectual Property, UW2220, 709 Swedeland Road, P.O. box 1539, King of Prussia, PA 19406-0939 (US).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report

(54) Title: ANTIBODY FORMULATIONS

(57) Abstract: This invention relates to a shear and temperature stable antibody formulations that are more stable than compared to a standard formulation (such as 30 mM citrate, 100mM NaCl, pH 6.5). The present invention's shear and temperature stable antibody formulations show reduced precipitation when subjected to stress conditions but the standard formulation had aggregated. This result was unpredictable because thermodynamically the two formulations are similar as seen by their DSC (differential scanning calorimeter) profiles.

WO 2009/009407 A1

66

## ANTIBODY FORMULATIONS

### FIELD OF THE INVENTION

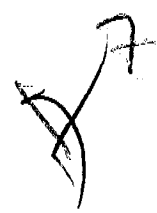
This invention relates to shear and the temperature stable antibody formulations.

### BACKGROUND OF THE INVENTION

Proteins are larger and more complex than traditional organic and inorganic drugs (i.e. possessing multiple functional groups in addition to complex three-dimensional structures), and the formulation of such proteins poses special problems. For a protein to remain biologically active, a formulation must preserve the intact conformational integrity of at least a core sequence of the protein's amino acids while at the same time protecting the protein's multiple functional groups from degradation. Degradation pathways for proteins can involve chemical instability (i.e. any process which involves modification of the protein by bond formation or cleavage resulting in a new chemical entity) or physical instability (i.e. changes in the higher order structure of the protein). Chemical instability can result from deamidation, racemization, hydrolysis, oxidation, beta elimination or disulfide exchange. Physical instability can result from denaturation, aggregation, precipitation or adsorption, for example. The three most common protein degradation pathways are protein aggregation, deamidation and oxidation. Cleland et al. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993).

The CD20 molecule (also called human B-lymphocyte-restricted differentiation antigen or Bp35) is a hydrophobic transmembrane protein with a molecular weight of approximately 35 kD located on pre-B and mature B lymphocytes (Valentine et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264(19):11282-11287; and Einfield et al. (1988) *EMBO J.* 7(3):711-717). CD20 is found on the surface of greater than 90% of B cells from peripheral blood or lymphoid organs and is expressed during early pre-B cell development and remains until plasma cell differentiation. CD20 is present on both normal B cells as well as malignant B cells. In particular, CD20 is expressed on greater than 90% of B cell non-Hodgkin's lymphomas (NHL) (Anderson et al. (1984) *Blood* 63(6):1424-1433), but is not found on hematopoietic stem cells, pro-B cells, normal plasma cells, or other normal tissues (Tedder et al. (1985) *J. Immunol.* 135(2):973-979).

The 85 amino acid carboxyl-terminal region of the CD20 protein is located within the cytoplasm. The length of this region contrasts with that of other B cell-specific surface structures such as IgM, IgD, and IgG heavy chains or histocompatibility antigens class II .alpha. or .beta.



chains, which have relatively short intracytoplasmic regions of 3, 3, 28, 15, and 16 amino acids, respectively (Komaromy et al. (1983) NAR 11:6775-6785). Of the last 61 carboxyl-terminal amino acids, 21 are acidic residues, whereas only 2 are basic, indicating that this region has a strong net negative charge. The GenBank Accession No. is NP.sub.--690605.

It is thought that CD20 might be involved in regulating an early step(s) in the activation and differentiation process of B cells (Tedder et al. (1986) Eur.J. Immunol. 16:881-887) and could function as a calcium ion channel (Tedder et al. (1990) J. Cell. Biochem. 14D:195).

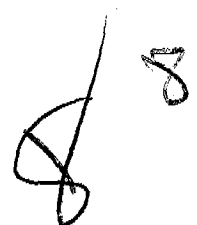
Despite uncertainty about the actual function of CD20 in promoting proliferation and/or differentiation of B cells, it provides an important target for antibody mediated therapy to control or kill B cells involved in cancers and autoimmune disorders. In particular, the expression of CD20 on tumor cells, e.g., NHL, makes it an important target for antibody mediated therapy to specifically target therapeutic agents against CD20-positive neoplastic cells.

HuMax-CD20™ (ofatumumab), described as 2F2 antibody in WO2004/035607, is a fully human IgG1, $\kappa$  high-affinity antibody targeted at the CD20 molecule in the cell membrane of B-cells. HuMax-CD20™ is in clinical development for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL), chronic lymphocytic leukemia (CLL), and rheumatoid arthritis (RA). See also Teeling et al., Blood, 104, pp 1793 (2004); and Teeling et al., J. Immunology, 177, pp 362-371 (2007).

There is a need for formulating a shear and temperature stable pharmaceutical formulation comprising an antibody which is suitable for therapeutic use. In one embodiment the antibody can be a monoclonal antibody. In another embodiment the antibody can be an anti-CD20 antibody, including but not limited to ofatumumab, rituximab, tositumomab, ocrelizumab (2H7.v16), 11B8 or 7D8 (disclosed in WO2004/035607), an anti-CD20 antibody disclosed in WO 2005/103081 such as C6, an anti-CD antibody disclosed in WO2003/68821 such as IMMU-106 (from Immunomedics), an anti-CD20 antibody disclosed in WO2004/103404 such as AME-133 (from Applied Molecular Evolution/Lilly), and anti-CD20 antibody disclosed in US 2003/0118592 such as TRU-015 (from Trubion Pharmaceuticals Inc).

## SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a shear and temperature stable aqueous antibody formulation.



This invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

Although one embodiment is adapted to a full length monoclonal anti-CD20 antibody formulation, it may also be used for the formulation of other classes of antibodies, for example, polyclonal antibodies, or fragments of monoclonal or polyclonal antibodies.

In one embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation comprising a therapeutically effective amount of an anti-CD20 antibody, wherein the formulation further comprises 10 to 100 mM sodium acetate, 25 to 100 mM sodium chloride, 0.5 to 5% arginine free base, 0.02 to 0.2 mM EDTA, 0.01 to 0.2 % polysorbate 80 and adjusted to pH 5.0 to 7.0.

In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation comprising an anti-CD20 antibody in the concentration range of 20-300 mg/mL, wherein the formulation further comprises 50 mM sodium acetate, 51 mM sodium chloride, 1% arginine free base, 0.05 mM EDTA, 0.02% polysorbate 80, and adjusted to pH 5.5. In another embodiment, the antibody is an anti-CD20 antibody fragment, such as a monoclonal antibody fragment. The preferred anti-CD20 antibody is ofatumumab.

In one embodiment, the invention relates to an ofatumumab formulation comprising a therapeutically effective amount of ofatumumab, wherein the formulation further comprises 10 to 100 mM sodium acetate, 25 to 100 mM sodium chloride, 0.5 to 5% arginine free base, 0.02 to 0.2 mM EDTA, 0.01 to 0.2 % polysorbate 80 and adjusted to pH 5.0 to 7.0.

In one embodiment, the invention relates to an ofatumumab formulation comprising an ofatumumab in the concentration range of 20-300 mg/mL, wherein the formulation further comprises 50 mM sodium acetate, 51 mM sodium chloride, 1% arginine free base, 0.05 mM EDTA, 0.02% polysorbate 80, and adjusted to pH 5.5.

In yet another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein the formulation is stable for at least 2 years. In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein the formulation is stable at temperatures up to at least 55°C. In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein the formulation is stable at a temperature of about 5°C for at least 2 years.

99

In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein the formulation is stable at a temperature of about 25°C for at least 3 months. In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein the formulation is stable at a temperature of about 40°C for at least 1 month. In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein the formulation is stable at a temperature of about 55°C for at least 1 day. In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein the formulation is stable at a temperature range of approximately, 5 to 25°C, 5 to 35°C, 5 to 45°C, 10 to 25°C, 10 to 35°C, 10 to 45°C, 10 to 55°C, 20 to 35°C, 20 to 45°C, or 20 to 55°C for at least 1 day with shaking..

In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein the antibody is present in an amount of about 20-300 mg/mL, 50-300 mg/mL, 100-300 mg/mL, 150-300 mg/mL, 200-300 mg/mL, or 250-300 mg/mL.

In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein sodium acetate is present in an amount of about 50mM, 40mM, 45mM, 55mM, or 60mM. In other embodiments, the sodium acetate may be present in an amount of 10 to 100 mM, 20 to 100 mM, 30 to 100 mM, 40 to 100 mM, 50 to 100 mM, 60 to 100 mM, 70 to 100 mM, 25 to 80 mM, or 30 to 70 mM.

In yet another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein acetic acid is present (about 100 mM acetic acid) to adjust the formulation to about pH 5.5. In other embodiments, the pH may be adjusted to pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 or 7.0. In yet other embodiments of the invention, NaOH or HCl is used to adjust the pH to 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 or 7.0.

In yet another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein sodium chloride is present in an amount of about 51mM, 45mM, 46mM, 47mM, 48mM, 49mM, 50mM, 52mM, 53mM, 54mM, 55mM. In other embodiments, the sodium chloride may be present in an amount of 25 to 100 mM, 35 to 90 mM, 45 to 80 mM, 25 to 70 mM, or 45 to 70 mM.

In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein arginine free base is present in an amount of about 1%, 0.7%, 1.3%, or 2.0%. In other embodiments, the arginine free base may be between 0.5 and 5.0%, 0.5 to 2.0%, 0.5 to 2.5%, 0.5 to 3.0%, 0.5 to 3.5%, 0.5 to 4.0%, or 0.5 to 4.5%.

(10) 10

In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein EDTA is present in an amount of about 0.05 mM, 0.03 mM, 0.04 mM, or 0.06 mM. In other embodiments, the EDTA may be present in an amount of 0.02 mM - 0.2 mM, 0.02 mM - 0.1 mM, 0.02 mM - 0.15 mM, 0.04 mM - 0.1 mM, 0.03 mM - 0.15 mM, or 0.03 mM - 0.2 mM.

In another embodiment, the invention relates to an anti-CD20 antibody formulation wherein polysorbate 80 is present in an amount of about 0.02%, 0.015%, or 0.025%. In other embodiments, the polysorbate 80 may be present in an amount of 0.01 - 0.2%, 0.01 - 0.15%, 0.02 - 0.2%, 0.02 - 0.15%, 0.01 - 0.25%, or 0.01 - 0.05%.

In another embodiment, the invention relates to a method of treating a disease involving cells expressing CD20 by administering to a mammal an anti-CD20 antibody formulation of the present invention comprising a therapeutically effective amount of an anti-CD20 antibody, wherein the formulation further comprises 10 to 100 mM sodium acetate, 25 to 100 mM sodium chloride, 0.5 to 5% arginine free base, 0.02 to 0.2 mM EDTA, 0.01 to 0.2 % polysorbate 80 and adjusted to pH 5.0 to 7.0. Exemplary "diseases involving cells expressing CD20" that can be treated (e.g., ameliorated) or prevented include, but are not limited to, tumorigenic diseases and immune diseases, e.g., autoimmune diseases. Examples of tumorigenic diseases which can be treated and/or prevented include B cell lymphoma, e.g., NHL, including precursor B cell lymphoblastic leukemia/lymphoma and mature B cell neoplasms, such as B cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)/small lymphocytic lymphoma (SLL), B cell prolymphocytic leukemia, lymphoplasmacytic lymphoma, mantle cell lymphoma (MCL), follicular lymphoma (FL), including low-grade, intermediate-grade and high-grade FL, cutaneous follicle center lymphoma, marginal zone B cell lymphoma (MALT type, nodal and splenic type), hairy cell leukemia, diffuse large B cell lymphoma, Burkitt's lymphoma, plasmacytoma, plasma cell myeloma, post-transplant lymphoproliferative disorder, Waldenstrom's macroglobulinemia, and anaplastic large-cell lymphoma (ALCL). Examples of immune disorders in which CD20 expressing B cells are involved which can be treated and/or prevented include psoriasis, psoriatic arthritis, dermatitis, systemic scleroderma and sclerosis, inflammatory bowel disease (IBD), Crohn's disease, ulcerative colitis, respiratory distress syndrome, meningitis, encephalitis, uveitis, glomerulonephritis, eczema, asthma, atherosclerosis, leukocyte adhesion deficiency, multiple sclerosis, Raynaud's syndrome, Sjogren's syndrome, juvenile onset diabetes, Reiter's disease, Behcet's disease, immune complex nephritis, IgA nephropathy, IgM polyneuropathies,

H 11

immune-mediated thrombocytopenias, such as acute idiopathic thrombocytopenic purpura and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, hemolytic anemia, myasthenia gravis, lupus nephritis, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis (RA), atopic dermatitis, pemphigus, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, Wegener's granulomatosis, Osler-Weber's syndrome, chronic renal failure, acute infectious mononucleosis, HIV, and herpes virus associated diseases. Further examples are severe acute respiratory distress syndrome and choroiretinitis. Yet further examples are diseases and disorders caused by infection of B-cells with virus, such as Epstein-Barr virus (EBV). Yet a further example is COPD.

In yet another embodiment, the invention relates to a method of treating a disease involving cells expressing CD20 by administering to a mammal an anti-CD20 antibody formulation of the present invention comprising a therapeutically effective amount of an anti-CD20 antibody, wherein the formulation further comprises 10 to 100 mM sodium acetate, 25 to 100 mM sodium chloride, 0.5 to 5% arginine free base, 0.02 to 0.2 mM EDTA, 0.01 to 0.2 % polysorbate 80 and adjusted to pH 5.0 to 7.0 and wherein the stable antibody formulation is administered orally, parenterally, intranasally, vaginally, rectally, lingually, sublingually, buccally, transdermally, intravenously, or subcutaneously to a mammal.

In yet another embodiment, the invention relates to a method of treating a disease involving cells expressing CD20 by administering to a mammal an anti-CD20 antibody formulation of the present invention comprising an anti-CD20 antibody in the concentration range of 20-300 mg/mL, wherein the formulation further comprises 50 mM sodium acetate, 51 mM sodium chloride, 1% arginine free base, 0.05 mM EDTA, 0.02% polysorbate 80, and adjusted to pH 5.5. The preferred anti-CD20 antibody is ofatumumab.

It is to be understood that both the foregoing summary description and the following detailed description are exemplary and explanatory, and are intended to provide further explanation of the invention as claimed.

The accompanying drawings are included to provide a further understanding of the invention, and are incorporated in, and constitute a part of this specification, illustrate several embodiments of the invention, and together with the description serve to explain the principles of the invention.

122R

**BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES**

Figure 1 illustrates the standard formulation (RefMat) of anti-CD20 antibody at 20 mg/mL (30 mM citrate, 100mM NaCl, pH 6.5) in duplicate.

Figure 2 illustrates one embodiment of the invention (PlatForm) formulation of anti-CD20 antibody at 20 mg/mL (50 mM sodium acetate, sodium chloride (51 mM), 1% arginine free base, 0.05 mM EDTA, 0.02% polysorbate 80, and adjusted to pH to 5.5 with HCl) in duplicate.

Figure 3 graphically illustrates a comparison of anti-CD20 antibody thermal stability in a formulation embodiment of the invention (PlatForm) and standard formulation buffers (RefMat) by DSC. Thermodynamically, the two formulations are similar as seen by their DSC profiles since the change in apparent  $T_m$  is less than 0.5°C between the formulations.

**DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

One embodiment of the present invention relates to shear and temperature stable antibody formulations.

In another embodiment, the invention provides for an unexpected stability seen for a formulation under simultaneous stress conditions of elevated temperature and shaking at 55°C.

A further embodiment of the invention is a more stable formulation than compared to a standard formulation (such as 30 mM citrate, 100mM NaCl, pH 6.5). The present invention's formulation showed reduced precipitation (remained clear) when subjected to stress conditions but the standard formulation had aggregated. This result was unpredictable because thermodynamically the two formulations are similar as seen by their DSC (differential scanning calorimeter) profiles.

In the description of the present invention, certain terms are used as defined below.

The term "protein formulation" or "antibody formulation" refers to preparations which are in such form as to permit the biological activity of the active ingredients to be unequivocally effective, and which contain no additional components which are toxic to the subjects to which the formulation would be administered.

"Pharmaceutically acceptable" excipients (vehicles, additives) are those which can reasonably be administered to a subject mammal to provide an effective dose of the active

1343

ingredient employed. For example, the concentration of the excipient is also relevant for acceptability for injection.

A "stable" formulation is one in which the protein therein essentially retains its physical and/or chemical stability and/or biological activity upon storage. Various analytical techniques for measuring protein stability are available in the art and are reviewed in Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993), for example. Stability can be measured at a selected temperature for a selected time period. Preferably, the formulation is stable at ambient temperature or at 40°C for at least 1 month and/or stable at 2-8°C for at least 1 to 2 years. Furthermore, it is desirable that the formulation be stable following freezing (e.g. to -70°C) and thawing of the product.

A protein "retains its physical stability" in a biopharmaceutical formulation if it shows little to no change in aggregation, precipitation and/or denaturation as observed by visual examination of color and/or clarity, or as measured by UV light scattering (measures visible aggregates) or size exclusion chromatography (SEC). SEC measures soluble aggregates that are not necessarily a precursor for visible aggregates.

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

An antibody "retains its biological activity" in a pharmaceutical formulation, if the change in the biological activity of the antibody at a given time is within about 10% (within the errors of the assay) of the biological activity exhibited at the time the pharmaceutical formulation was prepared as determined in an antigen binding assay, for example. Other "biological activity" assays for antibodies are elaborated herein below.

FHM

The term "isotonic" means that the formulation of interest has essentially the same osmotic pressure as human blood. In one embodiment, the isotonic formulations of the invention will generally have an osmotic pressure in the range of 250 to 350 mOsm. In other embodiments, isotonic formulations of the invention will have an osmotic pressure from about 350 to 450 mOsm. In yet another embodiment, isotonic formulations of the invention will have an osmotic pressure above 450 mOsm. Isotonicity can be measured using a vapor pressure or ice-freezing type osmometer for example.

As used herein, "buffer" refers to a buffered solution that resists changes in pH by the action of its acid-base conjugate components. In one embodiment, the buffer of this invention has a pH in the range from about 4.5 to about 6.0; in another embodiment, from about 4.8 to about 5.8; and in a further embodiment, a pH of about 5.5. Examples of buffers that will control the pH in this range include acetate (e.g. sodium acetate), succinate (such as sodium succinate), gluconate, histidine, citrate and other organic acid buffers. Where a freeze-thaw stable formation is desired, the buffer is preferably not phosphate.

In a pharmacological sense, in the context of the present invention, a "therapeutically effective amount" of an antibody refers to an amount effective in the prevention or treatment of a disorder for the treatment of which the antibody is effective. A "disorder" is any condition that would benefit from treatment with the antibody. This includes chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions which predispose the mammal to the disorder in question. In a preferred embodiment "disorder" is a disease involving cells expressing CD20.

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

The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers monoclonal antibodies (including full length monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multispecific

B<sup>15</sup>

antibodies (e.g. bispecific antibodies), and antibody fragments so long as they exhibit the desired biological activity.

"Antibody fragments" comprise a portion of a full length antibody, generally the antigen binding or variable region thereof. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragments.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to conventional (polyclonal) antibody preparations which typically include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determination on the antigen. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler et al., Nature 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the technique described in Clackson et al., Nature 352:624-626 (1991) and Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), for example.

"Humanized" forms of non-human (e.g., murine) antibodies are chimeric antibodies which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, FR residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues which are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable

7616

domains, in which all or substantially all of the hypervariable regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

"Single-chain Fv" or "sFv" antibody fragments comprise the  $V_H$  and  $V_L$  domain of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the  $V_H$  and  $V_L$  domains which enables the SFv to form the desired structure for antigen binding. For a view of sFv see Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, N.Y., pp. 269-315 (1994).

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a heavy chain variable domain ( $V_H$ ) connected to a light chain variable domain ( $V_L$ ) in the same polypeptide chain ( $V_H$  and  $V_L$ ). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993).

The expression "linear antibodies" when used throughout the application refers to the antibodies described in Zapata et al. *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995). Briefly, these antibodies comprise a pair of tandem Fd segments ( $V_H$ -- $C_H$ -- $V_{H1}$ -- $C_{H1}$ ) which form a pair of antigen binding regions. Linear antibodies can be bispecific or monospecific.

The antibody which is formulated is preferably essentially pure and desirably essentially homogenous (i.e. free from contaminating proteins etc). "Essentially pure" antibody means a composition comprising at least about 90% by weight of the antibody, based on total weight of the composition, preferably at least about 95% by weight. "Essentially homogeneous" antibody means a composition comprising at least about 99% by weight of the antibody, based on total weight of the composition.

17

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

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including but not limited to humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as dogs, horses, cats, and cows.

"Stress condition" refers to an environment which is chemically and physically unfavorable for a protein and may render unacceptable protein stability (e.g. thermal, shear, chemical stress).

Size Exclusion Chromatography is a chromatographic method in which particles are separated based on their size or hydrodynamic volume.

Dynamic Light Scattering is a method which measures the time dependence of protein scattered light. Traditionally, this time dependence is processed to yield the hydrodynamic radius of a molecule.

"DSC" refers to differential scanning calorimeter: DSC acquisition parameters: can be but not limited to, 1 mg/ml protein, scan for 5 to 80°C with a scan rate of 70°C per hour and 15 minute prewait. A buffer-buffer scan can be acquired first and subtracted from the raw data. The data can be corrected for the buffer and normalized for the protein concentration then plotted. Aggregation can prevent baseline correction.

The following examples are further illustrative of the present invention. The examples are not intended to limit the scope of the present invention, and provide further understanding of the invention.

## EXAMPLES

The invention is further illustrated by way of the following examples which are intended to elucidate the invention. These examples are not intended, nor are they to be construed, as limiting the scope of the invention. Numerous modifications and variations of the present invention are possible in view of the teachings herein and, therefore, are within the scope of the invention. The examples below are carried out using standard techniques, and such standard

18

techniques are well known and routine to those of skill in the art, except where otherwise described in detail.

**Example 1.1: Preparation of the platform formulation buffer**

In one embodiment of the invention, 4 liters of acetate buffer were prepared. In this embodiment, the final buffer was comprised of 50 mM sodium acetate, 0.05 mM EDTA, 51 mM NaCl, 1.0% Arginine, 0.02% Polysorbate 80, pH 5.5. The buffer was prepared by dissolving sodium acetate trihydrate, edetate disodium (EDTA), polysorbate 80 and L-arginine free base into 3.5L of deionized water. Once the pH was adjusted to 5.5 using 3N HCl, the volume was brought up to 4.0L and the buffer was filtered using a 0.45  $\mu$ m filter unit. The buffer can then be stored at 2-8°C until use. The formulation "%" described in the present application refers to "% by volume".

**Example 2.1: Preparation of ofatumumab in a platform formulation buffer**

In one embodiment of the invention, ofatumumab was diafiltrated into a platform formulation (50 mM Sodium Acetate, 51 mM NaCl, 0.05mM EDTA, 0.02% Polysorbate 80, and 1.0% Arginine (free-base)) and concentrated for stability. Ofatumumab was diafiltrated in to the platform formulation using a lab-scale tangential flow system with three membranes. After the diafiltration into the platform buffer, ofatumumab was concentrated to a maximum concentration of 179 mg/mL. The entire process took approximately three working days to complete and the yield was 96.1%. Some of the 179 mg/mL was diluted with platform formulation buffer so that a concentration range of ~20 – 179 mg/mL could be studied.

**Example 3.1: Preparation of ofatumumab in Standard and Platform Formulation for General Appearance (GA) Direct Comparison**

An anti-CD20 antibody (ofatumumab) was prepared in the standard formulation and the platform (one embodiment of the present invention) formulation at a concentration of 20 mg/mL for general appearance in direct comparison over a 12 week time period and for shake experiments. The anti-CD20 antibody in the standard and platform formulations were filtered

19

using a low protein binding 0.2 µm membrane filter. After the filtration, each formulation was filled at 3 mL into 5 cc vials, stoppered and crimped using sterile technique under the clean hood. Two vials of each formulation were placed on a shaker with temperature control. The vials were shaken at 325 RPM at a temperature of 55°C. During the shaking with heat, the general appearance was observed, as described in Example 3.2, periodically over a 42 hour time period. Figures 1 and 2 show the standard and platform formulations, respectively, after 18.5 hours of shaking with heat. The overall appearance results of the shake study indicated that the standard formulation will generate particles over time when subjected to shaking at 55 degree C temperatures more rapidly than the platform formulation.

**Example 3.2: GA, 18.5 hrs Shake study-General Appearance ofatumumab, 20 and 100 mg/mL**

General appearance (GA) of an anti-CD20 mab shake study samples is presented in the table below. GA was completed using a general method which can be used for an IgG antibody solution which describes color, clarity and visible particulate matter.

| <u>Shake Time Point</u> | <u>Appearance</u>                                 |
|-------------------------|---------------------------------------------------|
| <b>Initial</b>          |                                                   |
| Standard                | Clear, Colorless, 1-2 Particles present           |
| Platform                | Clear, Colorless, Particle Free                   |
| <b>18.5 hours</b>       |                                                   |
| Standard                | Clear, Colorless, Several large Particles Present |
| Platform                | Clear, Colorless, Particle Free                   |
| <b>42 hours</b>         |                                                   |
| Standard                | Hazy, Colorless, Several Large particles present  |
| Platform                | Slightly hazy, colorless, particle free           |

**Example 4: To determine the thermal stability of ofatumumab solution in the standard and platform buffer by Differential Scanning Calorimetry (DSC).**

In order to properly complete the testing by DSC, scans of the buffers alone and with protein were acquired. The protein in the standard and platform formulations were diluted to 1 mg/mL as presented in Example 4.1. Data was acquired setting the DSC to scan from 5 – 80°C at a scan rate of 70°C per hour with a 15 minute equilibration before each scan. The volume of the DSC sample cell is ~ 0.5 mL. After the scans of the buffer and protein were acquired, the buffer scans could then be subtracted from the protein scan. A concentration of the protein in the samples was obtained to correct for the concentration in each scan (See, Example 4.2). The values for  $T_{un}$ , °C, start of unfolding,  $T_m$ , °C, denaturation temperature (at transition maximum) and  $T_{1/2}$ , °C, the width of the peak at half-height (reflect changes in tertiary structure and cooperativity of the transitions) were obtained for ofatumumab for each formulation (See, Example 4.3). The actual DSC scans can be seen in Figure 3. Based on the results of the DSC, the ofatumumab in either the standard formulation or the platform formulation had similar DSC profiles and therefore would be expected to have similar thermal stability.

**Example 4.1: Sample preparation for biophysical characterization of ofatumumab pH study:****1. DILUTIONS**

| pH                          | Buffer                                                          | Initial conc. mg/ml | Dilute to 1 mg/ml for DSC |           |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------|-----------|
|                             |                                                                 |                     | ml sample                 | ml buffer |
| 6.5<br>Standard Formulation | 30 mM citrate, 100mM NaCl                                       | 17                  | 0.1                       | 1.6       |
| 5.5<br>Platform Formulation | 50 mM acetate, 51 mM NaCl, 0.05 mM EDTA, 1% Arg, 0.02% Tween-80 | 20                  | 0.075                     | 1.43      |

**Example 4.2: A280 MEASUREMENTS**

| pH                          | Buffer                                                          | Initial conc. mg/ml | Measured conc. of 0.5 mg/ml dilution |         |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|---------|
|                             |                                                                 |                     | mg/ml                                | mM*     |
| 6.5<br>Standard Formulation | 30 mM citrate, 100 mM NaCl                                      | 17                  | 0.517                                | 0.00345 |
| 5.5<br>Platform Formulation | 50 mM acetate, 51 mM NaCl, 0.05 mM EDTA, 1% Arg, 0.02% Tween-80 | 20                  | 0.444                                | 0.00296 |

\*use to normalize DSC scans.

Prep one sample, blank with corresponding buffer, read 3 times. Use 1 cm cuvette. Subtract A320 absorbance before dividing by extinction coefficient (1.49).

2/21

**Example 4.3: DSC results**

| Sample               | pH  | Buffer                                                          | T <sub>onset</sub> , °C | T <sub>m</sub> , °C | T <sub>1/2</sub> , °C | Notes                           |
|----------------------|-----|-----------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Standard Formulation | 6.5 | 30 mM citrate, 100 mM NaCl                                      | 62                      | 68.8                | 2.9*                  |                                 |
| Platform Formulation | 5.5 | 50 mM acetate, 51 mM NaCl, 0.05 mM EDTA, 1% Arg, 0.02% Tween-80 | 60                      | 68.4                | 3.2*                  | Similar to Standard Formulation |

- \* The T<sub>1/2</sub> values were determined manually. The exothermic contribution from aggregation distorts the baseline, thus these values may be artificially small.

In more detailed embodiments, the anti-CD20 antibody formulation of the present invention can be used to treat a subject with a tumorigenic disorder, e.g., a disorder characterized by the presence of tumor cells expressing CD20 including, for example, B cell lymphoma, e.g., NHL. Examples of tumorigenic diseases which can be treated and/or prevented include B cell lymphoma, e.g., NHL, including precursor B cell lymphoblastic leukemia/lymphoma and mature B cell neoplasms, such as B cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)/small lymphocytic lymphoma (SLL), B cell prolymphocytic leukemia, lymphoplasmacytic lymphoma, mantle cell lymphoma (MCL), follicular lymphoma (FL), including low-grade, intermediate-grade and high-grade FL, cutaneous follicle center lymphoma, marginal zone B cell lymphoma (MALT type, nodal and splenic type), hairy cell leukemia, diffuse large B cell lymphoma, Burkitt's lymphoma, plasmacytoma, plasma cell myeloma, post-transplant lymphoproliferative disorder, Waldenstrom's macroglobulinemia, and anaplastic large-cell lymphoma (ALCL).

Further examples of B cell non-Hodgkin's lymphomas are lymphomatoid granulomatosis, primary effusion lymphoma, intravascular large B cell lymphoma, mediastinal large B cell lymphoma, heavy chain diseases (including .gamma., .mu., and .alpha. disease), lymphomas induced by therapy with immunosuppressive agents, such as cyclosporine-induced lymphoma, and methotrexate-induced lymphoma.

In a further embodiment, anti-CD20 antibody formulation of the present invention can be used to treat Hodgkin's lymphoma.

Examples of immune disorders (diseases) in which cells expressing CD20 which can be treated and/or prevented by an anti-CD20 antibody formulation of the present invention include

autoimmune disorders, such as psoriasis, psoriatic arthritis, dermatitis, systemic scleroderma and sclerosis, inflammatory bowel disease (IBD), Crohn's disease, ulcerative colitis, respiratory distress syndrome, meningitis, encephalitis, uveitis, glomerulonephritis, eczema, asthma, atherosclerosis, leukocyte adhesion deficiency, multiple sclerosis, Raynaud's syndrome, Sjogren's syndrome, juvenile onset diabetes, Reiter's disease, Behcet's disease, immune complex nephritis, IgA nephropathy, IgM polyneuropathies, immune-mediated thrombocytopenias, such as acute idiopathic thrombocytopenic purpura and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, hemolytic anemia, myasthenia gravis, lupus nephritis, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis (RA), atopic dermatitis, pemphigus, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, Wegener's granulomatosis, Omenn's syndrome, chronic renal failure, acute infectious mononucleosis, HIV, and herpes virus associated diseases. Further examples are severe acute respiratory distress syndrome and choreoretinitis. Furthermore, other diseases and disorders include those caused by or mediated by infection of B-cells with virus, such as Epstein-Barr virus (EBV).

Further examples of inflammatory, immune and/or autoimmune disorders in which autoantibodies and/or excessive B lymphocyte activity are prominent and which can be treated and/or prevented by anti-CD20 antibody formulation of the present invention, include the following:

vasculitides and other vessel disorders, such as microscopic polyangiitis, Churg-Strauss syndrome, and other ANCA-associated vasculitides, polyarteritis nodosa, essential cryoglobulinaemic vasculitis, cutaneous leukocytoclastic angiitis, Kawasaki disease, Takayasu arteritis, giant cell arthritis, Henoch-Schonlein purpura, primary or isolated cerebral angiitis, erythema nodosum, thrombangiitis obliterans, thrombotic thrombocytopenic purpura (including hemolytic uremic syndrome), and secondary vasculitides, including cutaneous leukocytoclastic vasculitis (e.g., secondary to hepatitis B, hepatitis C, Waldenstrom's macroglobulinemia, B-cell neoplasias, rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, or systemic lupus erythematosus); further examples are erythema nodosum, allergic vasculitis, panniculitis, Weber-Christian disease, purpura hyperglobulinaemica, and Buerger's disease; skin disorders, such as contact dermatitis, linear IgA dermatosis, vitiligo, pyoderma gangrenosum, epidermolysis bullosa acquisita, pemphigus vulgaris (including cicatricial pemphigoid and bullous pemphigoid), alopecia areata (including alopecia universalis and alopecia totalis), dermatitis herpetiformis, erythema multiforme, and chronic autoimmune urticaria (including angioneurotic edema and urticarial

732

vasculitis); immune-mediated cytopenias, such as autoimmune neutropenia, and pure red cell aplasia; connective tissue disorders, such as CNS lupus, discoid lupus erythematosus, CREST syndrome, mixed connective tissue disease, polymyositis/dermatomyositis, inclusion body myositis, secondary amyloidosis, cryoglobulinemia type I and type II, fibromyalgia, phospholipid antibody syndrome, secondary hemophilia, relapsing polychondritis, sarcoidosis, stiff man syndrome, and rheumatic fever; a further example is eosinophil fasciitis; arthritides, such as ankylosing spondylitis, juvenile chronic arthritis, adult Still's disease, and SAPHO syndrome; further examples are sacroileitis, reactive arthritis, Still's disease, and gout; hematologic disorders, such as aplastic anemia, primary hemolytic anemia (including cold agglutinin syndrome), hemolytic anemia secondary to CLL or systemic lupus erythematosus; POEMS syndrome, pernicious anemia, and Waldenström's purpura hyperglobulinaemia; further examples are agranulocytosis, autoimmune neutropenia, Franklin's disease, Seligmann's disease,  $\mu$ -chain disease, paraneoplastic syndrome secondary to thymoma and lymphomas, and factor VIII inhibitor formation; endocrinopathies, such as polyendocrinopathy, and Addison's disease; further examples are autoimmune hypoglycemia, autoimmune hypothyroidism, autoimmune insulin syndrome, de Quervain's thyroiditis, and insulin receptor antibody-mediated insulin resistance; hepato-gastrointestinal disorders, such as celiac disease, Whipple's disease, primary biliary cirrhosis, chronic active hepatitis, and primary sclerosing cholangitis; a further example is autoimmune gastritis; nephropathies, such as rapid progressive glomerulonephritis, post-streptococcal nephritis, Goodpasture's syndrome, membranous glomerulonephritis, and cryoglobulinemic nephritis; a further example is minimal change disease; neurological disorders, such as autoimmune neuropathies, mononeuritis multiplex, Lambert-Eaton's myasthenic syndrome, Sydenham's chorea, tabes dorsalis, and Guillain-Barré's syndrome; further examples are myelopathy/tropical spastic paraparesis, myasthenia gravis, acute inflammatory demyelinating polyneuropathy, and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy; cardiac and pulmonary disorders, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), fibrosing alveolitis, bronchiolitis obliterans, allergic aspergillosis, cystic fibrosis, Löffler's syndrome, myocarditis, and pericarditis; further examples are hypersensitivity pneumonitis, and paraneoplastic syndrome secondary to lung cancer; allergic disorders, such as bronchial asthma and hyper-IgE syndrome; a further example is amaurosis fugax; ophthalmologic disorders, such as idiopathic chorioretinitis; infectious diseases, such as

parvovirus B infection (including hands-and-socks syndrome); and gynecological-obstretical disorders, such as recurrent abortion, recurrent fetal loss, and intrauterine growth retardation; a further example is paraneoplastic syndrome secondary to gynaecological neoplasms; male reproductive disorders, such as paraneoplastic syndrome secondary to testicular neoplasms; and transplantation-derived disorders, such as allograft and xenograft rejection, and graft-versus-host disease.

In one embodiment, the disease involving cells expressing CD20 is an inflammatory, immune and/or autoimmune disorder selected from ulcerative colitis, Crohn's disease, juvenile onset diabetes, multiple sclerosis, immune-mediated thrombocytopenias, such as acute idiopathic thrombocytopenic purpura and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, hemolytic anemia (including autoimmune hemolytic anemia), myasthenia gravis, systemic sclerosis, and pemphigus vulgaris.

This invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

**WHAT IS CLAIMED IS:**

1. An anti-CD20 antibody formulation comprising a therapeutically effective amount of an anti-CD20 antibody, wherein the formulation further comprises 10 to 100 mM sodium acetate, 25 to 100 mM sodium chloride, 0.5 to 5% arginine free base, 0.02 to 0.2 mM EDTA, 0.01 to 0.2 % polysorbate 80 and adjusted to pH 5.0 to 7.0.
2. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the anti-CD20 antibody is selected from the group consisting of : a monoclonal anti-CD20 antibody fragment and a full length anti-CD20 antibody.
3. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the anti-CD20 antibody is a monoclonal antibody.
4. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the formulation is stable is stable at a temperature of about 5°C for at least 2 years.
5. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the formulation is stable at a temperature of about 25°C for at least 3 months.
6. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the formulation is stable at a temperature of about 40°C for at least 1 month.
7. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the formulation is stable at a temperature of about 55°C for at least 1 day.
8. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the formulation is stable at a temperature range of approximately, 5 to 55°C for at least 1 day with shaking.
9. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the anti-CD20 antibody is present in an amount of about 20-300 mg/mL.

26  
JP

10. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the sodium acetate is present in an amount of about 50mM.
11. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the anti-CD20 antibody formulation is about pH 5.5.
12. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the sodium chloride is present in an amount of about 51mM.
13. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the arginine free base is present in an amount of about 1%.
14. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the EDTA is present in an amount of about 0.05 mM.
15. The anti-CD20 antibody formulation of Claim 1, wherein the polysorbate 80 is present in an amount of about 0.02%.
16. An anti-CD20 antibody formulation comprising an anti-CD20 antibody in the concentration range of 20-300 mg/mL, wherein the formulation further comprises 50 mM sodium acetate, 51 mM sodium chloride, 1% arginine free base, 0.05 mM EDTA, 0.02% polysorbate 80, and adjusted to pH 5.5.
17. An ofatumumab antibody formulation comprising a ofatumumab in the concentration range of 20-300 mg/mL, wherein the formulation further comprises 50 mM sodium acetate, 51 mM sodium chloride, 1% arginine free base, 0.05 mM EDTA, 0.02% polysorbate 80, and adjusted to pH 5.5.
18. A method of treating a disease involving cells expressing CD20 in a mammal, comprising administering an anti-CD20 antibody formulation comprising a therapeutically effective

2A

amount of an anti-CD20 antibody, wherein the formulation further comprises 10 to 100 mM sodium acetate, 25 to 100 mM sodium chloride, 0.5 to 5% arginine free base, 0.02 to 0.2 mM EDTA, 0.01 to 0.2 % polysorbate 80 and adjusted to pH 5.0 to 7.0.

19. A method of treating a disease involving cells expressing CD20 in a mammal, comprising administering an ofatumumab antibody formulation comprising a ofatumumab in the concentration range of 20-300 mg/mL, wherein the formulation further comprises 50 mM sodium acetate, 51 mM sodium chloride, 1% arginine free base, 0.05 mM EDTA, 0.02% polysorbate 80, and adjusted to pH 5.5.
20. The method according to claim 18 or 19, wherein the formulation is administered to a mammal by intravenous or subcutaneous route.
21. A method of claim 18 or 19 in which a disease involving cells expressing CD20 is selected from the group consisting of tumorigenic diseases and immune diseases.
22. A method of claim 21 in which tumorigenic diseases are B cell lymphomas selected from the group consisting of: precursor B cell lymphoblastic leukemia/lymphoma and mature B cell neoplasms, such as B cell chronic lymphocytic leukemia (CLL)/small lymphocytic lymphoma (SLL), B cell prolymphocytic leukemia, lymphoplasmacytic lymphoma, mantle cell lymphoma (MCL), follicular lymphoma (FL), including low-grade, intermediate-grade and high-grade FL, cutaneous follicle center lymphoma, marginal zone B cell lymphoma (MALT type, nodal and splenic type), hairy cell leukemia, diffuse large B cell lymphoma, Burkitt's lymphoma, plasmacytoma, plasma cell myeloma, post-transplant lymphoproliferative disorder, Waldenstrom's macroglobulinemia, and anaplastic large-cell lymphoma (ALCL).
23. A method of claim 21 in which immune diseases are selected from the group consisting of: psoriasis, psoriatic arthritis, dermatitis, systemic scleroderma and sclerosis, inflammatory bowel disease (IBD), Crohn's disease, ulcerative colitis, respiratory distress syndrome, meningitis, encephalitis, uveitis, glomerulonephritis, eczema, asthma, atherosclerosis, leukocyte adhesion deficiency, multiple sclerosis, Raynaud's syndrome, Sjogren's

syndrome, juvenile onset diabetes, Reiter's disease, Behcet's disease, immune complex nephritis, IgA nephropathy, IgM polyneuropathies, immune-mediated thrombocytopenias, such as acute idiopathic thrombocytopenic purpura and chronic idiopathic thrombocytopenic purpura, hemolytic anemia, myasthenia gravis, lupus nephritis, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis (RA), atopic dermatitis, pemphigus, Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, Wegener's granulomatosis, Omenn's syndrome, chronic renal failure, acute infectious mononucleosis, HIV, and herpes virus associated diseases.

24. An anti-CD20 antibody formulation of claim 1 or 16 in which the anti-CD20 antibody is selected from the group consisting of rituximab, tositumomab, ocrelizumab, 7D8, 11B8, C6, IMMU-106, AME-133, and TRU-015.
25. A method of claim 18 or 19 in which a disease involving cells expressing CD20 is COPD.

20/201

Figure 1

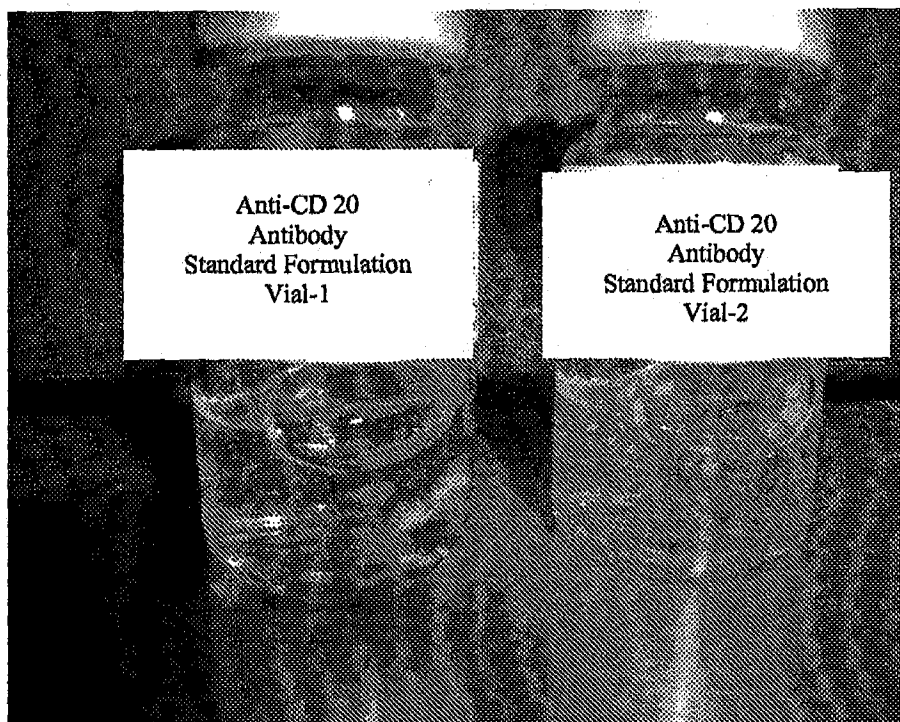


Figure 2

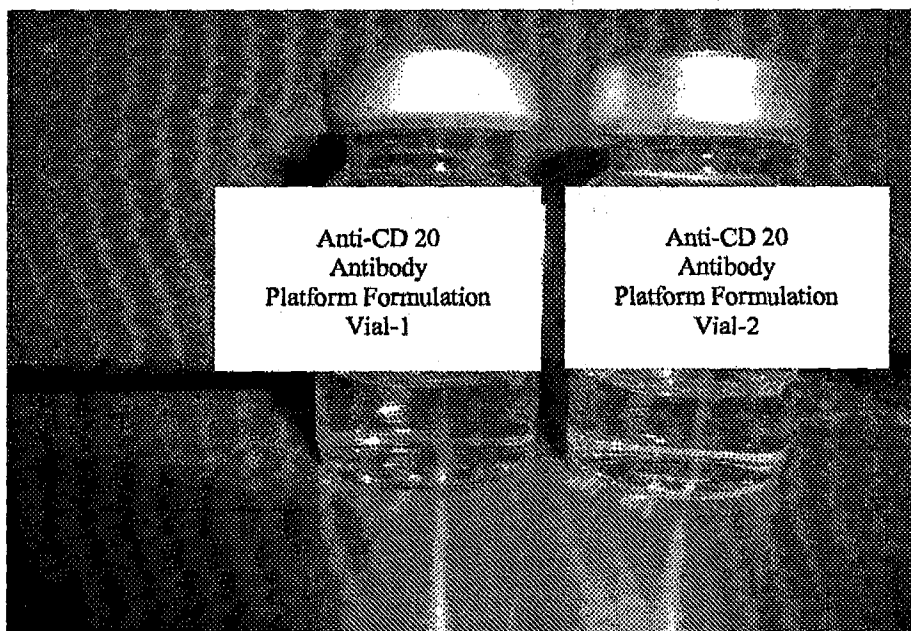


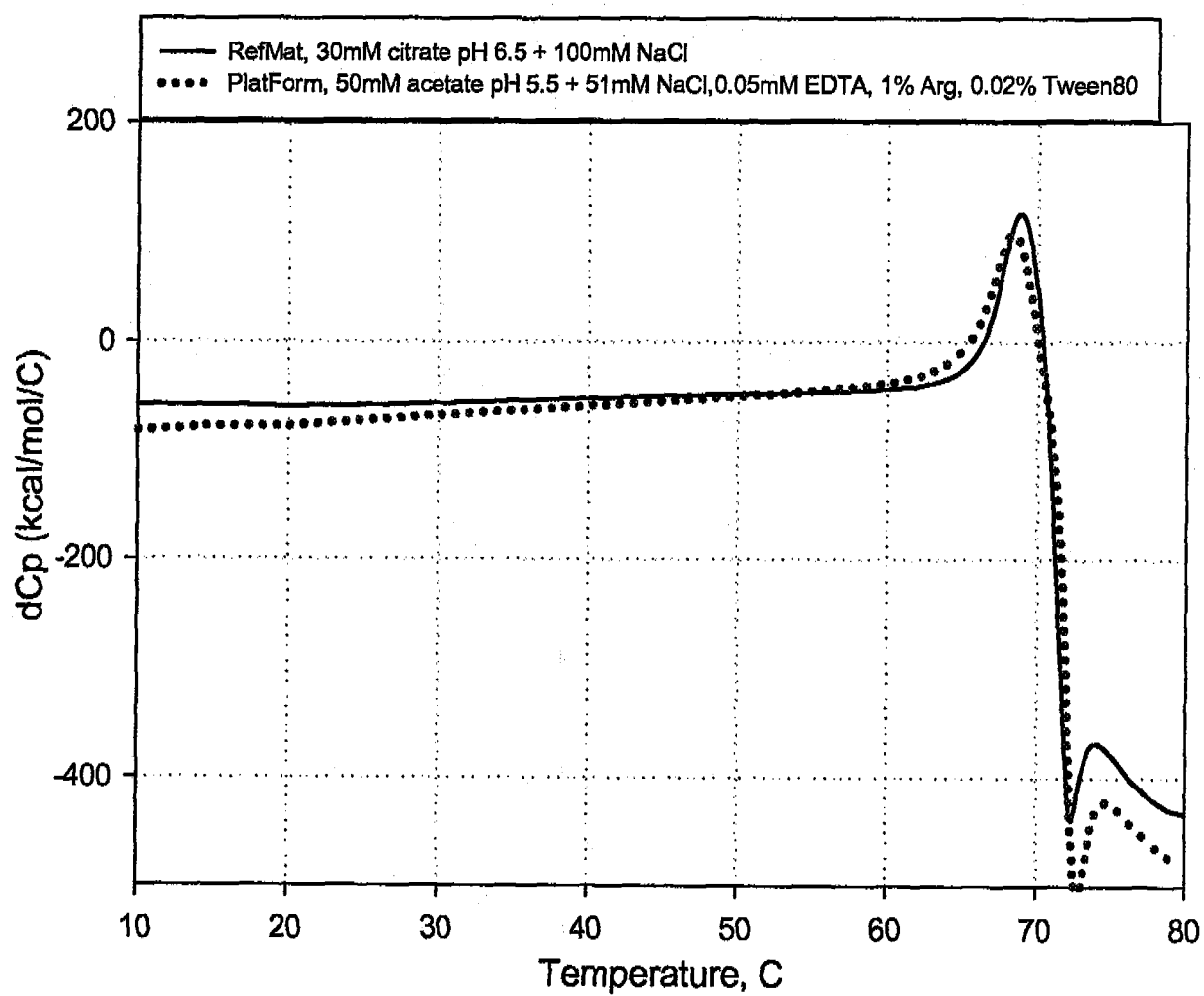
Figure 3 : DSC Scan

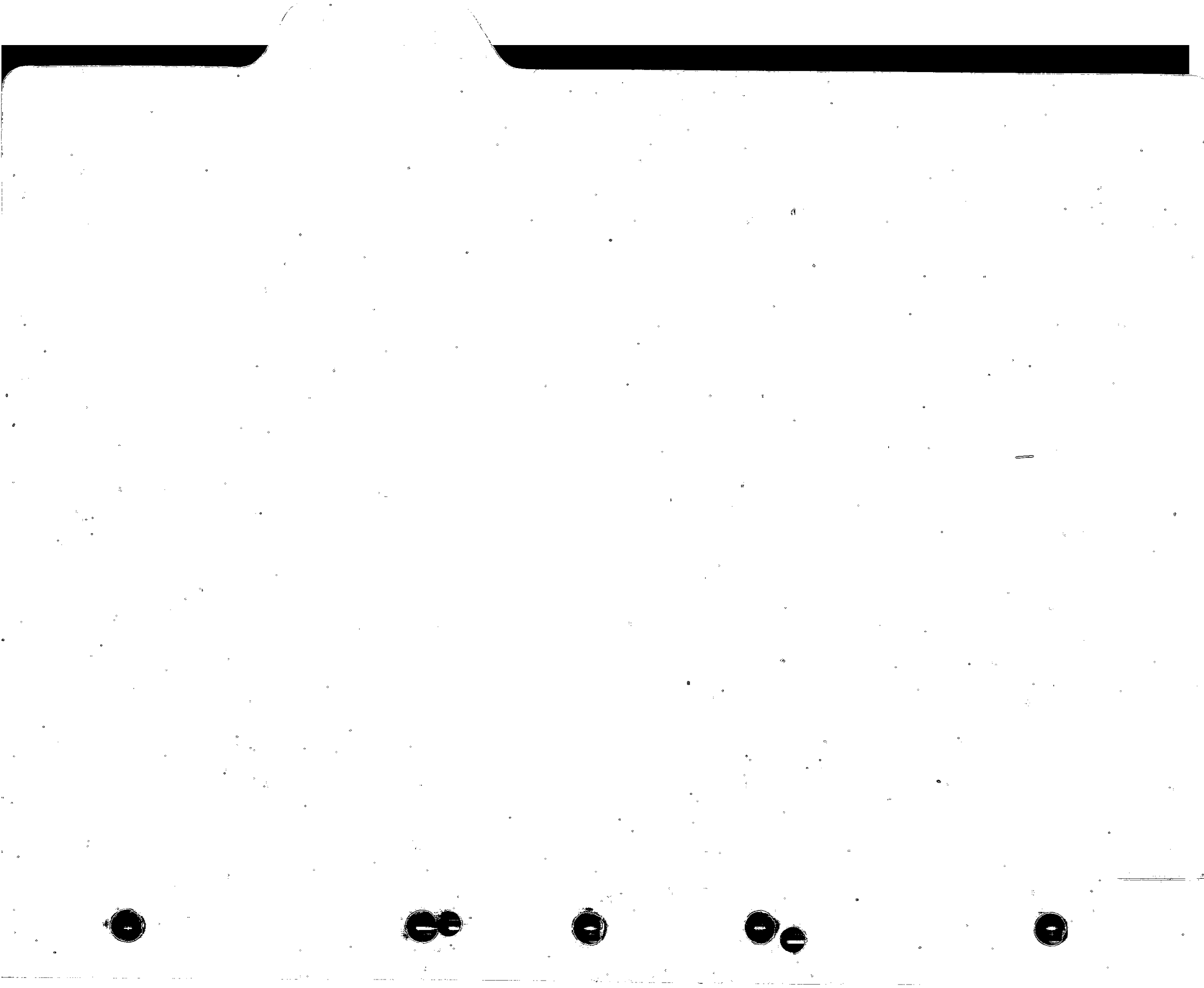
The unfolding transition is coupled with aggregation. The apparent  $T_m$ s are:

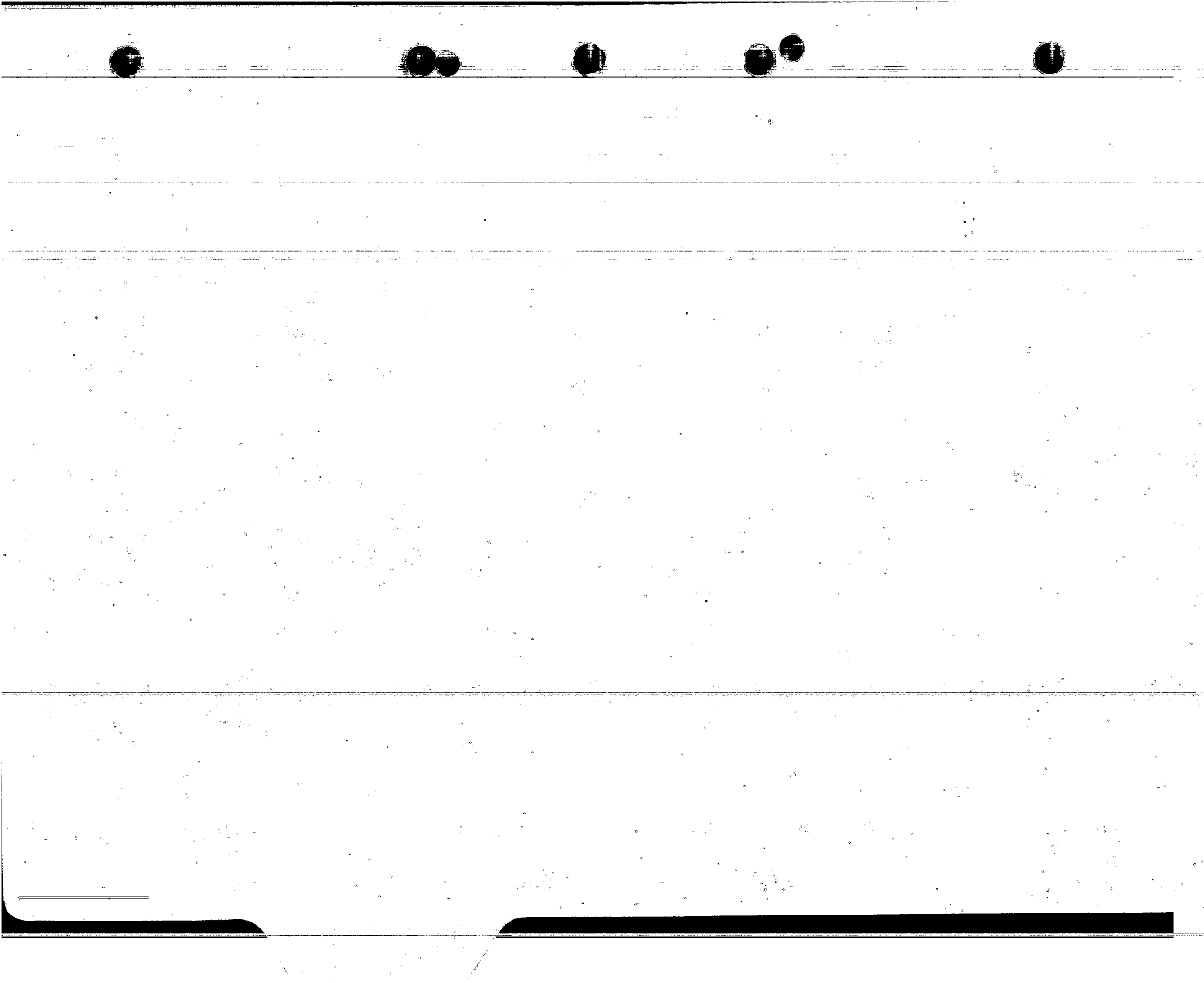
$T_{m, \text{platform}} = 68.4^\circ\text{C}$

$T_{m, \text{standard}} = 68.8^\circ\text{C}$

A  $\Delta T_m > 0.5^\circ\text{C}$  is considered significant.







31 31

## FORMULACIONES DE ANTICUERPOS

### CAMPO DE LA INVENCION

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

### 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

35 La región carboxilo terminal de 85 aminoácidos de la proteína CD20 está

32/32

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

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

A pesar de la incertidumbre sobre la función real de CD20 en la promoción de la proliferación y/o diferenciación de células B, proporciona un objetivo importante para la terapia mediada por anticuerpos para controlar o matar células B implicadas en cánceres y trastornos autoinmunes. En particular, la expresión de CD20 en células tumorales, p. ej., LNH. hace que sea un objetivo importante para la terapia mediada por anticuerpos para dirigir específicamente agentes terapéuticos contra las células neoplásicas positivas para CD20.

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

Existe la necesidad de formular una formulación farmacéutica estable a la temperatura y la cizalladura que comprenda un anticuerpo que sea adecuado para uso terapéutico. En una realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En otra realización el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD20, incluyendo pero no limitado a ofatumumab, rituximab, tositumomab, ocrelizumab (2H7.v16), 11B8 o 7D8 (descrito en el documento WO2004/035607), un anticuerpo anti-CD20 descrito en el documento WO 2005/103081 tal como C6, un anticuerpo anti-CD descrito en el documento WO2003/68821 tal como IMMU-106 (de Immunomedics), un anticuerpo anti-CD20 descrito en el documento WO2004/103404 tal como AME-133 (de Applied Molecular Evolution/Lilly), y un anticuerpo anti-CD20 descrito en el documento US

2003/0118592 tal como TRU-015 (from Trubion Pharmaceuticals Inc).

### COMPENDIO DE LA INVENCION

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

5 Esta invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en esta memoria. Por supuesto, diferentes modificaciones de la invención además de las descritas en esta memoria serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Dichas modificaciones se pretende que estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

10 Aunque una realización está adaptada a una formulación de anticuerpo anti-CD20 monoclonal de longitud entera, también se pueden usar para la formulación otras clases de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales o fragmentos de anticuerpos monoclonales o policlonales.

En una realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-  
15 CD20 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD20, en la que la formulación comprende además acetato sódico 10 a 100 mM, cloruro sódico 25 a 100 mM, base libre de la arginina al 0,5 a 5%, EDTA 0,02 a 0,2 mM, polisorbato 80 al 0,01 a 0,2% y está ajustada a pH 5,0 a 7,0.

En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-  
20 CD20 que comprende un anticuerpo anti-CD20 en el intervalo de concentración de 20-300 mg/ml, en el que la formulación además comprende acetato sódico 50 mM, cloruro sódico 51 mM, base libre de la arginina al 1%, EDTA 0,05 mM, polisorbato 80 al 0,02%, y está ajustada a pH 5,5. En otra realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo anti-CD20, tal como un fragmento de anticuerpo monoclonal. El anticuerpo  
25 anti-CD20 preferido es ofatumumab.

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

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

34 34

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

En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-  
20 CD20 en la que el anticuerpo está presente en una cantidad de aproximadamente 20-300 mg/ml, 50-300 mg/ml, 100-300 mg/ml, 150-300 mg/ml, 200-300 mg/ml o 250-300 mg/ml.

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

En otra realización más, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-CD20 en la que el ácido acético está presente (ácido acético aproximadamente  
30 100 mM) para ajustar la formulación a pH aproximadamente 5,5. En otras realizaciones, el pH se puede ajustar a pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 o 7,0. En otras realizaciones más de la invención, se usa NaOH o HCl para ajustar el pH a 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 ó 7,0.

En otra realización más, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo  
35 anti-CD20 en la que el cloruro sódico está presente en una cantidad de

aproximadamente 51 mM, 45 mM, 46 mM, 47 mM, 48 mM, 49 mM, 50 mM, 52 mM, 53 mM, 54 mM, 55 mM. En otras realizaciones, el cloruro sódico puede estar presente en una cantidad de 25 a 100 mM, 35 a 90 mM, 45 a 80 mM, 25 a 70 mM o 45 a 70 mM.

En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-  
5 CD20 en la que la base libre de arginina está presente en una cantidad de aproximadamente 1%, 0,7%, 1,3% o 2,0%. En otras realizaciones, la base libre de arginina puede estar entre 0,5 y 5,0%, 0,5 a 2,0%, 0,5 a 2,5%, 0,5 a 3,0%, 0,5 a 3,5%, 0,5 a 4,0% o 0,5 a 4,5%.

En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-  
10 CD20 en la que el EDTA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mM, 0,03 mM, 0,04 mM, o 0,06 mM. En otras realizaciones, el EDTA puede estar presente en una cantidad de 0,02 mM - 0,2 mM, 0,02 mM - 0,1 mM, 0,02 mM - 0,15 mM, 0,04 mM - 0,1 mM, 0,03 mM - 0,15 mM o 0,03 mM - 0,2 mM.

En otra realización, la invención se refiere a una formulación de anticuerpo anti-  
15 CD20 en la que el polisorbato 80 está presente en una cantidad de aproximadamente 0,02%, 0,015% o 0,025%. En otras realizaciones, el polisorbato 80 puede estar presente en una cantidad de 0,01 - 0,2%, 0,01 - 0,15%, 0,02 - 0,2%, 0,02 - 0,15%, 0,01 - 0,25% o 0,01 - 0,05%.

En otra realización, la invención se refiere a un método para tratar una  
20 enfermedad que implica células que expresan CD20 por administración a un mamífero de una formulación de anticuerpo anti-CD20 de la presente invención que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD20, en la que la formulación comprende además acetato sódico 10 a 100 mM, cloruro sódico 25 a 100 mM, base libre de arginina al 0,5 a 5%, EDTA 0,02 a 0,2 mM, polisorbato 80 al 0,01 a  
25 0,2% y está ajustada a pH 5,0 a 7,0. Las "enfermedades que implican células que expresan CD20" de ejemplo que se pueden tratar (p.ej., mejorar) o prevenir, incluyen, pero no se limitan a enfermedades tumorigénicas y enfermedades inmunes, p. ej., enfermedades autoinmunes. Los ejemplos de enfermedades tumorigénicas que se pueden tratar y/o prevenir, incluyen linfoma de células B, p. ej. LNH, leucemia/linfoma  
30 linfoblástico de células B precursoras y neoplasmas de células B maduras, tal como leucemia linfocítica crónica de células B (LLC)/linfoma linfocítico pequeño (LLP), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células del manto (LCM), linfoma folicular (LF), incluyendo LF de grado bajo, grado intermedio y grado alto, linfoma del centro del folículo cutáneo, linfoma de células B de zona  
35 marginal (tipo MALT, tipo nodal y esplénico), leucemia de células pilosas, linfoma de

células B grandes y difusas, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo postrasplante, macroglobulinemia de Waldenstrom y linfoma anaplásico de células grandes (LACG). Los ejemplos de trastornos inmunes en los que están implicadas células B que expresan CD20 que se

5 pueden tratar y/o prevenir incluyen psoriasis, artritis psoriática, dermatitis, esclerodermia sistémica y esclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome de dificultad respiratoria, meningitis, encefalitis, uveítis, glomerulonefritis, eczema, asma, aterosclerosis, deficiencia de adhesión leucocitaria, esclerosis múltiple, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjogren,

10 diabetes de inicio juvenil, enfermedad de Reiter, enfermedad de Behcet, nefritis por inmunocomplejo, nefropatía IgA, polineuropatías IgM, trombocitopenias inmunomediadas, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica, anemia hemolítica, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide (AR), dermatitis atópica, pénfigo, enfermedad

15 de Grave, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegner, síndrome de Omenn, insuficiencia renal crónica, mononucleosis infecciosa aguda, VIH y enfermedades asociadas con el virus del herpes. Otros ejemplos son síndrome de dificultad respiratoria grave y coriorretinitis. Otros ejemplos más son enfermedades y trastornos causados por infección de células B por virus, tales como el virus de Epstein-Barr

20 (VEB). Otro ejemplo más es la EPOC.

En otra realización más, la invención se refiere a un método para tratar una enfermedad que implica células que expresan CD20 por administración a un mamífero de una formulación de anticuerpo anti-CD20 de la presente invención que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD20, en la que la

25 formulación comprende además acetato sódico 10 a 100 mM, cloruro sódico 25 a 100 mM, base libre de arginina al 0,5 a 5%, EDTA 0,02 a 0,2 mM, polisorbato 80 al 0,01 a 0,2% y está ajustada a pH 5,0 a 7,0, y en la que la formulación de anticuerpo estable se administra por vía oral, parenteral, intranasal, vaginal, rectal, lingual, sublingual, bucal, transdérmica, intravenosa o subcutánea, a un mamífero.

30 En otra realización más, la invención se refiere a un método para tratar una enfermedad que implica células que expresan CD20 por administración a un mamífero de una formulación de un anticuerpo anti-CD-20 de la presente invención que comprende un anticuerpo anti-CD20 en el intervalo de concentración de 20-300 mg/ml, en la que la formulación además comprende acetato sódico 50 mM, cloruro sódico 51

35 mM, base libre de la arginina al 1%, EDTA 0,05 mM, polisorbato 80 al 0,02%, y está

27-37

ajustada a pH 5,5. El anticuerpo anti-CD20 preferido es ofatumumab.

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

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

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

- 10 La figura 1 ilustra la formulación estándar (RefMat) de anticuerpo anti-CD20 con 20 mg/ml (citrate 30 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5) por duplicado.

- La figura 2 ilustra una realización de la formulación de la invención (de plataforma) del anticuerpo anti-CD20 con 20 mg/ml (acetato sódico 50 mM, cloruro sódico (51 mM), base libre de la arginina al 1%, EDTA 0,05 mM, polisorbato 80 al 15 0,02% y ajustada a pH 5,5 con HCl) por duplicado.

- La figura 3 ilustra con una gráfica una comparación de la estabilidad térmica del anticuerpo anti-CD20 en una realización de formulación de la invención (de plataforma) y tampones de formulación estándar (RefMat) por DSC. Termodinámicamente, las dos formulaciones son similares como puede verse por sus perfiles de DSC, puesto que el 20 cambio en la  $T_m$  aparente es menor que 0,5°C entre las formulaciones.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

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

- En una realización, la invención proporciona una estabilidad inesperada que se 25 ve en una formulación en condiciones simultáneas de tensión de temperatura elevada y agitación a 55°C.

- Otra realización de la invención es una formulación más estable comparada con una formulación estándar (tal como citrate 30 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5). La formulación de la presente invención mostraba menor precipitación (permanecía 30 transparente) cuando se sometía a condiciones de tensión, mientras que la formulación estándar tenía agregados. Este resultado era impredecible porque termodinámicamente las dos formulaciones eran similares cuando se veían sus perfiles de DSC (calorimetría diferencial de barrido).

- En la descripción de la presente invención, algunos términos se usan como se 35 definen a continuación.

35 38

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

- 5 Los excipientes "farmacéuticamente aceptables" (vehículos, aditivos) son los que se pueden administrar razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis eficaz del principio activo usado. Por ejemplo, la concentración del excipiente también es importante para la aceptabilidad para inyección.

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

- 20 Una proteína "retiene su estabilidad física" en una formulación biofarmacéutica si muestra poco o no muestra cambio en la agregación, precipitación y/o desnaturalización cuando se observa por examen visual del color y/o transparencia, o cuando se mide por difracción de luz UV (mide agregados visibles) o por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC). Por  
25 SEC se miden los agregados solubles que no son necesariamente un precursor para los agregados visibles.

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

34 39

alteración química incluyen alteración de carga (p. ej., que se produce como resultado de desamidación) que se puede evaluar por cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo.

5 Un anticuerpo "retiene su actividad biológica" en una formulación farmacéutica, si el cambio en la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado está dentro de aproximadamente el 10% (dentro del error del ensayo) de la actividad biológica que presentaba en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica, determinado por un ensayo de unión al antígeno, por ejemplo. A continuación se elaboran otros ensayos de "actividad biológica" para anticuerpos en esta memoria.

10 El término "isotónico" significa que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. En una realización, las formulaciones isotónicas de la invención en general tendrán una presión osmótica en el intervalo de 250 a 350 mOsm. En otras realizaciones, las formulaciones isotónicas de la invención tendrán una presión osmótica de aproximadamente 350 a  
15 450 mOsm. En otra realización más, las formulaciones isotónicas de la invención tendrán una presión osmótica mayor que 450 mOsm. La isotonicidad se puede medir usando un osmómetro de presión de vapor o tipo congelación, por ejemplo.

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

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

40

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

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

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

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en esta memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, y están dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpo (policlonal) convencionales que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un solo determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe considerarse que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención se pueden hacer por el método del hibridoma descrito primero por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), o se pueden hacer por métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la patente de EE.UU.

nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos sobre fagos usando la técnica descrita por Clackson et al., *Nature* 352:624-626 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por ejemplo.

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

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "sFv" comprenden el dominio  $V_H$  y  $V_L$  del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. En general, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios  $V_H$  y  $V_L$  que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, N.Y., pp. 269-315 (1994).

La expresión "anticuerpos biespecíficos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) en la misma cadena de polipéptido ( $V_H$  y  $V_L$ ). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la

4242

misma cadena, los dominios son forzados a emparejar con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los anticuerpos biespecíficos se describen con más detalle, por ejemplo en el documento EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993).

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

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

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

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

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

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

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

"DSC" se refiere a la calorimetría diferencial de barrido: Parámetros de adquisición de DSC: pueden ser, pero no se limitan a proteína 1 mg/ml, barrido de 5 a

80°C con una velocidad de barrido de 70°C por hora y 15 minutos de espera entre barridos. Se puede hacer primero un barrido de tampón-tampón y después restarlo a los datos brutos. Los datos se pueden corregir para el tampón y normalizar para la concentración de proteína y después representar gráficamente. La agregación puede  
5 prevenir la corrección de la línea de valores iniciales.

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

### **EJEMPLOS**

10 La invención se ilustra con más detalle mediante los siguientes ejemplos que son para elucidar la invención. No se pretende, y no debe considerarse, que estos ejemplos limiten el alcance de la invención. Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención en vista de las enseñanzas en esta memoria y, por lo tanto, están dentro del alcance de la invención. Los siguientes ejemplos se  
15 llevan a cabo usando técnicas estándar y dichas técnicas estándar son bien conocidos y rutinarias para el experto en la técnica, excepto que se describa otra cosa en detalle.

#### **Ejemplo 1.1: Preparación del tampón de la formulación de plataforma**

En una realización de la invención, se prepararon 4 litros de tampón de acetato. En esta realización, el tampón final comprendía acetato sódico 50 mM, EDTA 0,05 mM,  
20 NaCl 51 mM, arginina al 1,0%, polisorbato 80 al 0,02%, pH 5,5. El tampón se preparó disolviendo trihidrato de acetato sódico, edetato sódico (EDTA), polisorbato 80 y base libre de la L-arginina en 3,5 litros de agua desionizada. Una vez ajustado el pH a 5,5 usando HCl 3 N, el volumen se llevó a 4,0 litros y el tampón se filtró usando una unidad de filtro de 0,45 µm. Después el tampón se puede almacenar a 2-8°C hasta su uso. El  
25 "%" de formulación descrito en la presente solicitud se refiere a "%" en volumen".

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

En una realización de la invención, se filtró por diálisis el ofatumumab en una formulación de plataforma (acetato sódico 50 mM, NaCl 51 mM, EDTA 0,05 mM,  
30 polisorbato 80 al 0,02%, arginina al 1,0% (base libre)), y se concentró para la estabilidad. Se filtró por diálisis el ofatumumab en la formulación de plataforma usando un sistema de flujo tangencial de escala de laboratorio con tres membranas. Después de la filtración por diálisis en el tampón de plataforma, el ofatumumab se concentró a una concentración máxima de 179 mg/ml. El procedimiento completo tardaba  
35 aproximadamente tres días de trabajo en completarse y el rendimiento era 96,1%.

44

Parte de los 179 mg/ml se diluyeron con el tampón de la formulación de plataforma modo que podía estudiarse un intervalo de concentraciones de ~20 – 179 mg/ml.

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

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

12 semanas  
3 meses

72h: 1,75d

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

- 25 En la siguiente tabla se presenta el aspecto general (AG) de las muestras en un estudio de agitación del mAb anti-CD20. El AG se completó usando un método general que se puede usar para una solución de anticuerpo IgG que describe el color, transparencia y materia en partículas visible.

#545

| <u>Tiempo de la agitación</u> | <u>Aspecto</u>                                              |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Inicial                       |                                                             |
| Estándar                      | Transparente, incoloro, 1-2 partículas presentes            |
| plataforma                    | Transparente, incoloro, sin partículas                      |
| <hr/>                         |                                                             |
| 18,5 horas                    |                                                             |
| Estándar                      | Transparente, incoloro, varias partículas grandes presentes |
| plataforma                    | Transparente, incoloro, sin partículas                      |
| <hr/>                         |                                                             |
| 42 horas                      |                                                             |
| Estándar                      | Turbio, incoloro, varias partículas grandes presentes       |
| plataforma                    | Ligeramente turbio, incoloro, sin partículas                |
| <hr/>                         |                                                             |

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

- 5 Con el fin de completar de forma adecuada el ensayo por DSC, se hicieron los barridos de los tampones solos y con proteína. La proteína en las formulaciones estándar y de plataforma se diluyeron a 1 mg/ml como se presenta en el ejemplo 4.1. Los datos se adquirieron ajustando el DSC a barrido de 5 – 80°C a una velocidad de barrido de 70°C por hora con un equilibrado de 15 minutos antes de cada barrido. El
- 10 volumen de la celda de muestra del DSC es ~ 0,5 ml. Después de hacer los barridos del tampón y la proteína, los barridos del tampón se podían restar del barrido de la proteína. Se obtuvo una concentración de la proteína en las muestras para corregir la concentración en cada barrido (véase, ejemplo 4.2). Se obtuvieron los valores de  $T_{un}$ , °C, inicio del desdoblamiento,  $T_m$ , °C, temperatura de desnaturalización (a la transición máxima) y  $T_{1/2}$ , °C, la anchura del pico a mitad de altura (refleja los cambios en la
- 15 estructura terciaria y cooperatividad de las transiciones) para el ofatumumab para cada formulación (véase, ejemplo 4.3). Los barridos de DSC se pueden ver en la figura 3. Basándose en los resultados de DSC, el ofatumumab tanto en la formulación estándar como en la formulación de plataforma tenía perfiles de DSC similares y por lo
- 20 tanto se esperaba que tuviera perfiles de estabilidad térmica similares.

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

#### 1. DILUCIONES

| pH                            | Tampón                                                          | Con. Inicial mg/ml | Dilución a 1 mg/ml para DSC |              |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------|
|                               |                                                                 |                    | ml de muestra               | ml de tampón |
| 6.5<br>Formulación estándar   | citrato 30 mM, NaCl 100 mM                                      | 17                 | 0,1                         | 1,6          |
| 5.5<br>Formulación plataforma | acetato 50 mM, NaCl 51 mM, EDTA 0,05 mM, Arg 1%, Tween-80 0,02% | 20                 | 0,075                       | 1,43         |

#### Ejemplo 4.2: MEDICIONES DE A280

| pH                            | Tampón                                                          | Con. Inicial mg/ml | Conc. medida de dilución de 0,5 mg/ml |         |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|---------|
|                               |                                                                 |                    | mg/ml                                 | mM*     |
| 6.5<br>Formulación estándar   | citrato 30 mM, NaCl 100 mM                                      | 17                 | 0,517                                 | 0,00345 |
| 5.5<br>Formulación plataforma | acetato 50 mM, NaCl 51 mM, EDTA 0,05 mM, Arg 1%, Tween-80 0,02% | 20                 | 0,444                                 | 0,00296 |

\*se usa para normalizar los barridos de DSC.

Preparar una muestra, blanco, con el correspondiente tampón, leer 3 veces.

- Usar una cubeta de 1 cm. Restar la absorbancia a A320 antes de dividir entre el coeficiente de extinción (1,49).

#### Ejemplo 4.3: Resultados de DSC

| Muestra                | pH  | Tampón                                                          | T <sub>un</sub> , °C | T <sub>m</sub> , °C | T <sub>1/2</sub> , °C | Notas                             |
|------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Formulación estándar   | 6,5 | citrato 30 mM, NaCl 100 mM                                      | 62                   | 68,8                | 2,9*                  |                                   |
| Formulación plataforma | 5,5 | acetato 50 mM, NaCl 51 mM, EDTA 0,05 mM, Arg 1%, Tween-80 0,02% | 60                   | 68,4                | 3,2*                  | Similar a la formulación estándar |

- \* Los valores de T<sub>1/2</sub> se determinaron manualmente. La contribución exotérmica de la agregación distorsiona la línea de valores iniciales, por lo que estos valores pueden ser artificialmente pequeños.

En realizaciones más detalladas, la formulación de anticuerpo anti-CD20 de la presente invención se puede usar para tratar a un sujeto con un trastorno tumorigénico, p. ej., un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CD20 incluyendo, por ejemplo, linfoma de células B. p. ej., LNH. Los  
5 ejemplos de enfermedades tumorigénicas que se pueden tratar y/o prevenir, incluyen linfoma de células B, p. ej. LNH, leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras y neoplasmas de células B maduras, tal como leucemia linfocítica crónica de células B (LLC)/linfoma linfocítico pequeño (LLP), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmaclítico, linfoma de células del manto (LCM), linfoma folicular (LF), incluyendo  
10 LF de grado bajo, grado intermedio y grado alto, linfoma del centro del folículo cutáneo, linfoma de células B de zona marginal (tipo MALT, tipo nodal y esplénico), leucemia de células pilosas, linfoma de células B grandes y difusas, linfoma de Burkitt, plasmacitoma, mieloma de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo postrasplante, macroglobulinemia de Waldenstrom y linfoma anaplásico de células  
15 grandes (LACG).

Otros ejemplos de linfomas de no Hodgkin de células B son granulomatosis linfomatoide, linfoma de efusión primaria, linfoma de células B grandes intravascular, linfoma de células B grandes en mediastino, enfermedades de la cadena pesada (incluyendo enfermedades de gamma, mu y alfa), linfomas inducidos por terapia con  
20 agentes inmunosupresores, tales como linfoma inducido por ciclosporina y linfoma inducido por metotrexato.

En otra realización, la formulación de anticuerpo anti-CD20 de la presente invención se puede usar para tratar el linfoma de no Hodgkin.

Los ejemplos de trastornos (enfermedades) inmunes en los que las células  
25 expresan CD20 que se pueden tratar y/o prevenir por una formulación de anticuerpo anti-CD20 de la presente invención incluyen enfermedades autoinmunes, tales como psoriasis, artritis psoriática, dermatitis, esclerodermia sistémica y esclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome de dificultad respiratoria, meningitis, encefalitis, uveítis, glomerulonefritis,  
30 eczema, asma, aterosclerosis, deficiencia de adhesión leucocitaria, esclerosis múltiple, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjogren, diabetes de inicio juvenil, enfermedad de Reiter, enfermedad de Behcet, nefritis por inmunocomplejo, nefropatía IgA, polineuropatías IgM, trombocitopenias inmunomediadas, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica,  
35 anemia hemolítica, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide

(AR), dermatitis atópica, pénfigo, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegner, síndrome de Omenn, insuficiencia renal crónica, mononucleosis infecciosa aguda, VIH y enfermedades asociadas con el virus del herpes. Otros ejemplos son síndrome de dificultad respiratoria grave y coriorretinitis.

- 5 Además, otras enfermedades y trastornos incluyen los causados por o mediados por infección de células B con virus, tales como el virus de Epstein-Barr (VEB).

- Otros ejemplos de trastornos inflamatorios, inmunes y/o autoinmunes en los que los autoanticuerpos y/o la actividad excesiva de linfocitos B son prominentes y que se pueden tratar y/o prevenir por la formulación de anticuerpo anti-CD20 de la presente
- 10 invención, incluyen los siguientes: vasculitis y otras enfermedades de los vasos, tales como poliangeítis microscópica, síndrome de Churg-Strauss y otras vasculitis asociadas con ANCA, poliarteritis nodosa, vasculitis crioglobulinémica esencial, angitis leucocitoclástica cutánea, enfermedad de Kawasaki, arteritis de Takayasu, artritis de células gigantes, púrpura de Henoch-Schonlein, angitis cerebral primaria o aislada,
- 15 eritema nodoso, tromboangitis obliterante, púrpura trombocitopénica trombótica (incluyendo síndrome urémico hemolítico), y vasculitis secundaria, incluyendo vasculitis leucocitoclástica cutánea (p. ej., secundaria a hepatitis B, hepatitis C, macroglobulinemia de Waldenstrom, neoplasias de células B, artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, o lupus eritematoso sistémico); otros ejemplos son eritema
- 20 nodoso, vasculitis alérgica, paniculitis, enfermedad de Weber-Christian, púrpura hiperglobulinémica y enfermedad de Buerger; trastornos de la piel, tales como dermatitis de contacto, dermatosis de IgA lineal, vitíligo, pioderma gangrenosa, epidermolisis bullosa adquirida, pénfigo vulgar (incluyendo penfigoide cicatrizal y penfigoide bulloso), alopecia areata (incluyendo alopecia universal y alopecia total),
- 25 dermatitis herpetiforme, eritema multiforme y urticaria autoinmune crónica (incluyendo edema angioneurótico y vasculitis urticarial); citopenias inmunomediadas, tales como neutropenia autoinmune y aplasia pura de glóbulos rojos; enfermedades del tejido conjuntivo, tales como lupus del SNC, lupus eritematoso discoide, síndrome de CREST, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, polimiositis/dermatomiositis, miositis
- 30 por cuerpos de inclusión, amiloidosis secundaria, crioglobulinemia de tipo I y tipo II, fibromialgia, síndrome de anticuerpos contra fosfolípidos, hemofilia secundaria, policondritis recidivante, sarcoidosis, síndrome de la persona rígida y fiebre reumática; un ejemplo adicional es la fascitis eosinófila; artritis tales como espondilitis anquilosante, artritis crónica juvenil, enfermedad de Still del adulto y síndrome de
- 35 SAPHO; otros ejemplos son sacroileítis, artritis reactiva, enfermedad de Still y gota;

trastornos hematológicos tales como anemia aplásica, anemia hemolítica primaria (incluyendo síndrome de la aglutinina), anemia hemolítica secundaria a LLC o lupus eritematoso sistémico; síndrome de POEMS, anemia perniciosa y púrpura hiperglobulinémica de Waldenström; otros ejemplos son agranulocitosis, neutropenia autoinmune, enfermedad de Franklin, enfermedad de Seligmann, enfermedad de la cadena mu., síndrome paraneoplásico secundario a timomas y linfomas, y formación de inhibidor del factor VIII; endocrinopatías, tales como poliendocrinopatía y enfermedad de Addison; otros ejemplos son hipoglucemia autoinmune, hipotiroidismo autoinmune, síndrome de insulina autoinmune, tiroiditis de Quervain y resistencia a insulina mediada por anticuerpo del receptor de insulina; trastornos hepatogastrointestinales, tales como enfermedad celiaca, enfermedad de Whipple, cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica y colangitis esclerosante primaria; otro ejemplo es la gastritis autoinmune; nefropatías, tales como glomerulonefritis progresiva rápida, nefritis postestreptocócica, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis membranosa y nefritis crioglobulinémica; otro ejemplo es la enfermedad de cambio mínimo; enfermedades neurológicas, tales como neuropatías autoinmunes, mononeuritis múltiples, síndrome miasténico Lambert-Eaton, corea de Sydenham, tabes dorsal y síndrome de Guillain-Barré; otros ejemplos son mielopatía/paraparesis espástica tropical, miastenia grave, polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; enfermedades cardíacas y pulmonares, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), alveolitis fibrosante, bronquiolitis obliterante, aspergilosis alérgica, fibrosis quística, síndrome de Löffler, miocarditis y pericarditis; otros ejemplos son neumonitis por hipersensibilidad y síndrome paraneoplásico secundario a cáncer de pulmón; trastornos alérgicos, tales como asma bronquial y síndrome de hiper-IgE; otro ejemplo es amaurosis fugax; trastornos oftalmológicos, tales como coriorretinitis idiopática; enfermedades infecciosas, tales como infección por parvovirus B (incluyendo el síndrome en guantes y medias); y trastornos ginecológico-obstétrico, tales como aborto recurrente, pérdida fetal recurrente y retraso del crecimiento intrauterino; un ejemplo más es el síndrome paraneoplásico secundario a neoplasmas ginecológicos; trastornos reproductivos en el hombre, tales como síndrome paraneoplásico secundario a neoplasmas testiculares; y trastornos derivados de trasplante, tales como rechazo de aloinjerto y xenoinjerto, y enfermedades de injerto contra huésped.

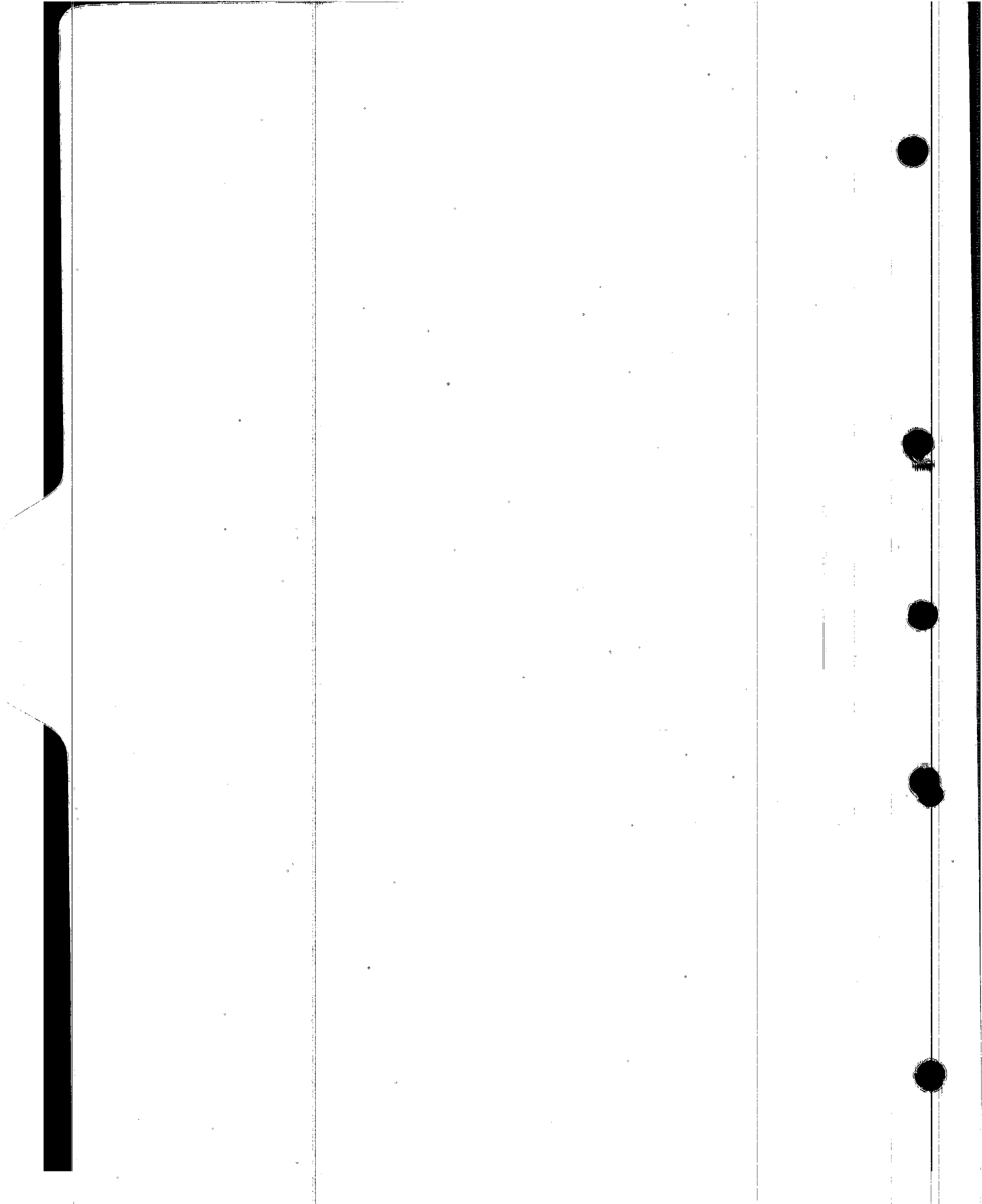
En una realización, la enfermedad que implica células que expresan CD20 es una enfermedad inflamatoria inmune y/o autoinmune seleccionada de colitis ulcerativa,

50

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

- 5 Esta invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en esta memoria. Por supuesto, diferentes modificaciones de la invención además de las descritas en esta memoria serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Dichas modificaciones se pretende que estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.





**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD20, en la que la formulación comprende además acetato sódico 10 a 100 mM, cloruro sódico 25 a 100 mM, base libre de arginina al 0,5 a 5%, EDTA 0,02 a 0,2 mM, polisorbato 80 al 0,01 a 0,2% y está ajustada a pH 5,0 a 7,0.
- 10 2. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo anti-CD20 se selecciona del grupo que consiste en: un fragmento de anticuerpo anti-CD20 monoclonal y un anticuerpo anti-CD20 de longitud entera.
- 15 3. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo monoclonal.
4. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 5°C durante al menos 2 años.
- 20 5. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 25°C durante al menos 3 meses.
- 25 6. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 40°C durante al menos 1 mes.
- 30 7. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que la formulación es estable a una temperatura de aproximadamente 55°C durante al menos 1 día.
- 35 8. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que la formulación es estable en un intervalo de temperatura de aproximadamente 5 a 55°C durante al menos 1 día con agitación.

5252

9. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo anti-CD20 está presente en una cantidad de aproximadamente 20-300 mg/ml.

5 10. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que el acetato sódico está presente en una cantidad de aproximadamente 50 mM.

10 11. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que la formulación de anticuerpo anti-CD20 tiene pH aproximadamente 5,5.

12. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que el cloruro sódico está presente en una cantidad de aproximadamente 51 mM.

15 13. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que la base libre de la arginina está presente en una cantidad de aproximadamente 1%.

14. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que el EDTA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,05 mM.

20 15. La formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1, en la que el polisorbato 80 está presente en una cantidad de aproximadamente 0,02%.

25 16. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 que comprende un anticuerpo anti-CD20 en el intervalo de concentración de 20-300 mg/ml, en la que la formulación además comprende acetato sódico 50 mM, cloruro sódico 51 mM, base libre de la arginina al 1%, EDTA 0,05 mM, polisorbato 80 al 0,02%, y está ajustada a pH 5,5.

30 17. Una formulación de anticuerpo ofatumumab que comprende ofatumumab en el intervalo de concentración de 20-300 mg/ml, en la que la formulación además comprende acetato sódico 50 mM, cloruro sódico 51 mM, base libre de la arginina al 1%, EDTA 0,05 mM, polisorbato 80 al 0,02%, y está ajustada a pH 5,5.

35 18. Un método para tratar una enfermedad que implica células que expresan CD20 en un mamífero, que comprende administrar una formulación de anticuerpo anti-CD20 que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-

5353

CD20, en el que la formulación además comprende acetato sódico 10 a 100 mM, cloruro sódico 25 a 100 mM, base libre de la arginina al 0,5 a 5%, EDTA 0,02 a 0,2 mM, polisorbato al 0,01 a 0,2% y está ajustada a pH de 5,0 a 7,0.

5           19. Un método para tratar una enfermedad que implica células que expresan CD20 en un mamífero, que comprende administrar una formulación de anticuerpo ofatumumab que comprende ofatumumab en el intervalo de concentración de 20-300 mg/ml, en el que la formulación además comprende acetato sódico 50 mM, cloruro sódico 51 mM, base libre de la arginina al 1%, EDTA 0,05 mM, polisorbato 80 al 0,02%,  
10 y está ajustada a pH 5,5.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 18 ó 19, en el que la formulación se administra a un mamífero por vía intravenosa o subcutánea.

15           21. Un método de la reivindicación 18 ó 19, en el que una enfermedad que implica células que expresan CD20 se selecciona del grupo que consiste en enfermedades tumorigénicas y enfermedades inmunes.

22. Un método de la reivindicación 21, en el que las enfermedades  
20 tumorigénicas son linfomas de células B seleccionados del grupo que consiste en: leucemia/linfoma linfoblástico de células B precursoras y neoplasmas de células B maduras, tal como leucemia linfocítica crónica de células B (LLC)/linfoma linfocítico pequeño (LLP), leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de células del manto (LCM), linfoma folicular (LF), incluyendo LF de grado bajo, grado  
25 intermedio y grado alto, linfoma del centro del folículo cutáneo, linfoma de células B de zona marginal (tipo MALT, tipo nodal y esplénico), leucemia de células pilosas, linfoma de células B grandes y difusas, linfoma de Burkitt, plasmocitoma, mieloma de células plasmáticas, trastorno linfoproliferativo postrasplante, macroglobulinemia de Waldenstrom y linfoma anaplásico de células grandes (LACG).

30           23. Un método de la reivindicación 21, en el que las enfermedades inmunes se seleccionan del grupo de: psoriasis, artritis psoriática, dermatitis, esclerodermia sistémica y esclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome de dificultad respiratoria, meningitis, encefalitis,  
35 uveítis, glomerulonefritis, eczema, asma, aterosclerosis, deficiencia de adhesión

leucocitaria, esclerosis múltiple, síndrome de Raynaud, síndrome de Sjogren, diabetes de inicio juvenil, enfermedad de Reiter, enfermedad de Behcet, nefritis por inmunocomplejo, nefropatía IgA, polineuropatías IgM, trombocitopenias inmunomediadas, tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura

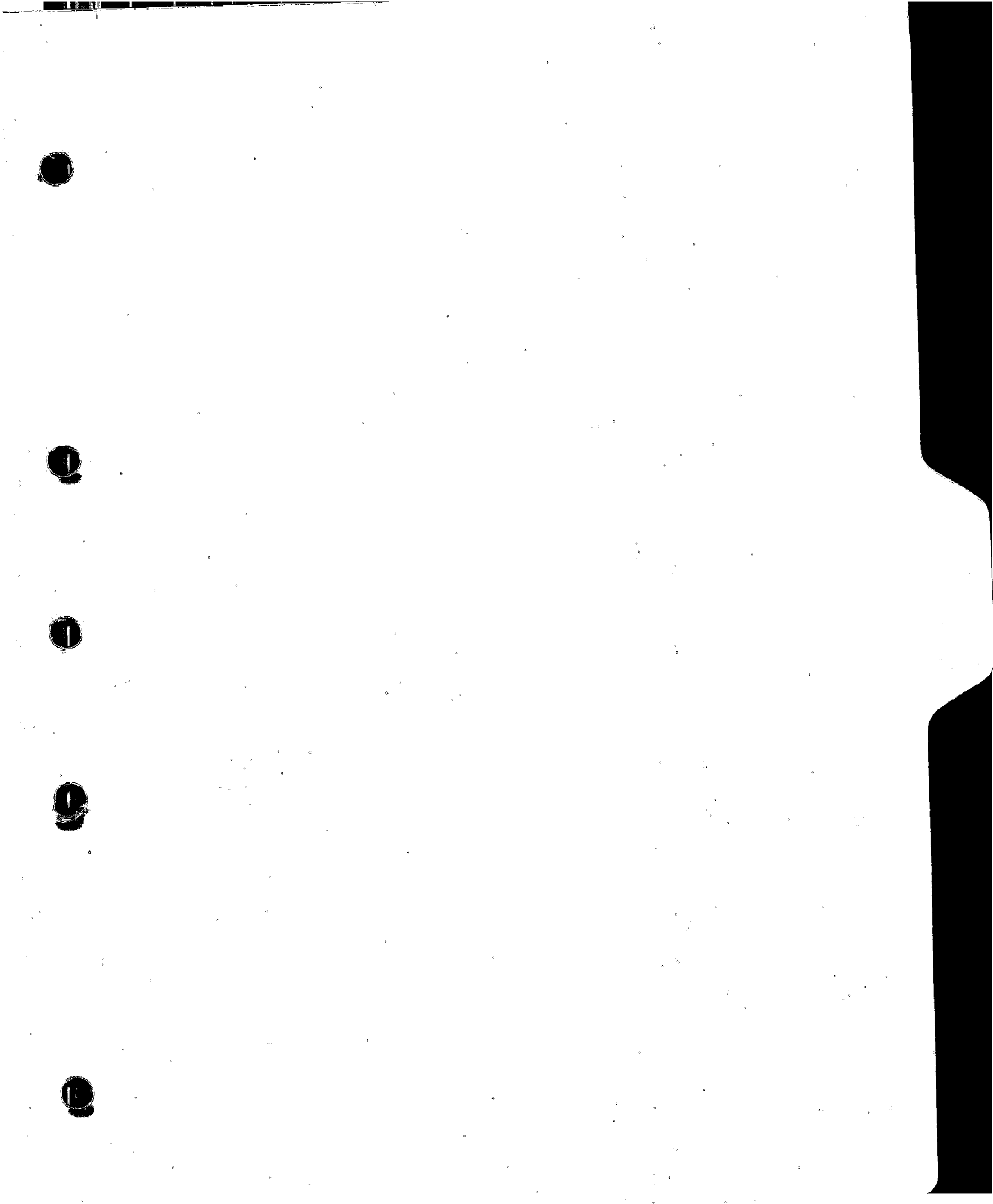
5 trombocitopénica idiopática crónica, anemia hemolítica, miastenia grave, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide (AR), dermatitis atópica, pénfigo, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegner, síndrome de Omenn, insuficiencia renal crónica, mononucleosis infecciosa aguda, VIH y enfermedades asociadas con el virus del herpes.

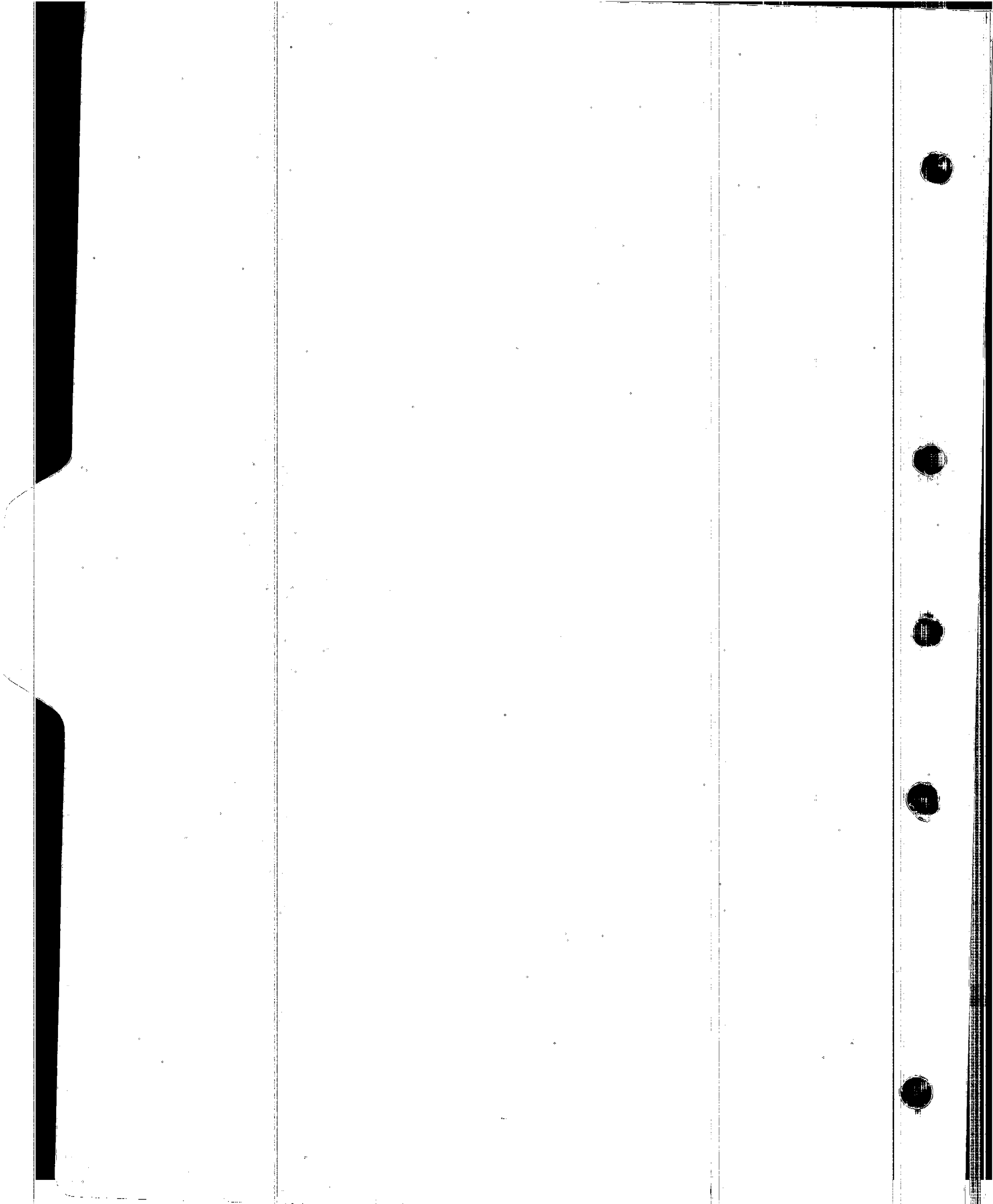
10

24. Una formulación de anticuerpo anti-CD20 de la reivindicación 1 ó 16, en la que el anticuerpo anti-CD20 se selecciona del grupo que consiste en rituximab, tositumomab, ocrelizumab, 7D8, 11B8, C6, IMMU-106, AME-133 y TRU-015.

15

25. Un método de la reivindicación 18 ó 19, en el que una enfermedad que implica células que expresan CD20 es la EPOC.





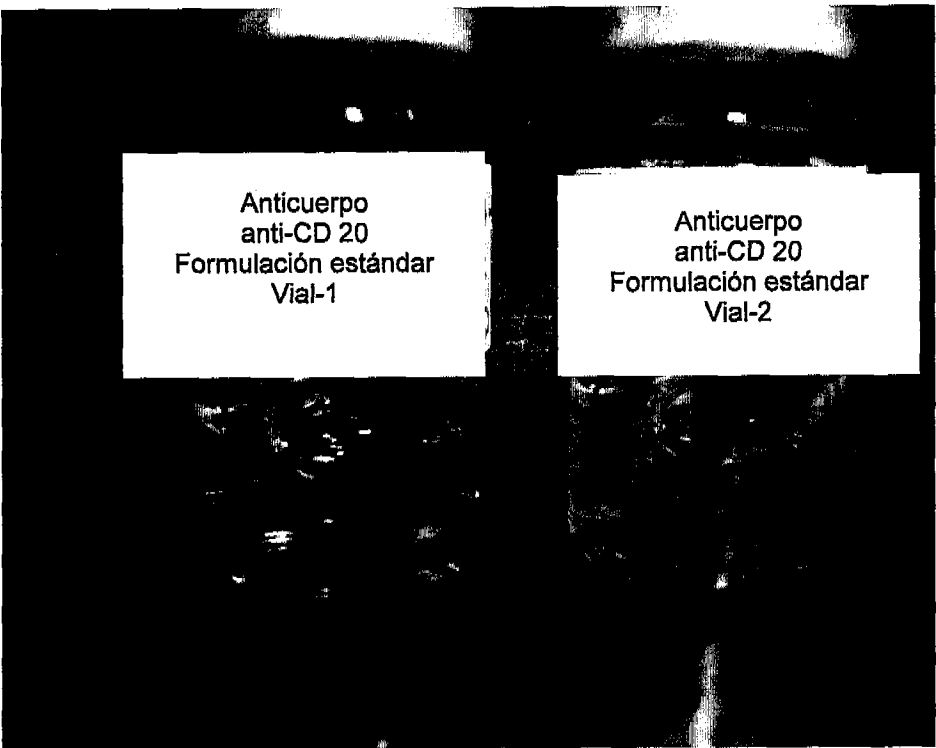
P55

**RESUMEN**

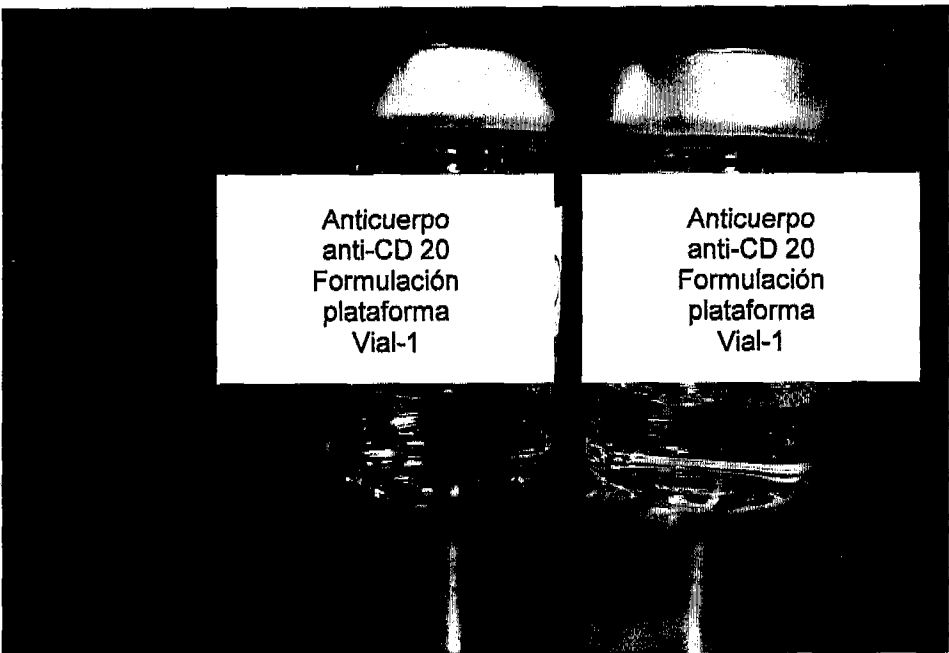
Esta invención se refiere a formulaciones de anticuerpo estables a la temperatura y la cizalladura, que son más estables comparadas con una formulación estándar (tal como citrato 30 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5). Las formulaciones de anticuerpo estables a la temperatura y la cizalladura de la presente invención mostraron menor precipitación cuando se sometían a condiciones de tensión, mientras que la formulación estándar se había agregado. Este resultado era impredecible porque termodinámicamente las dos formulaciones son similares, como se ve por sus perfiles de DSC (calorimetría diferencial de barrido).

56/56

Figura 1



5 Figura 2



3757

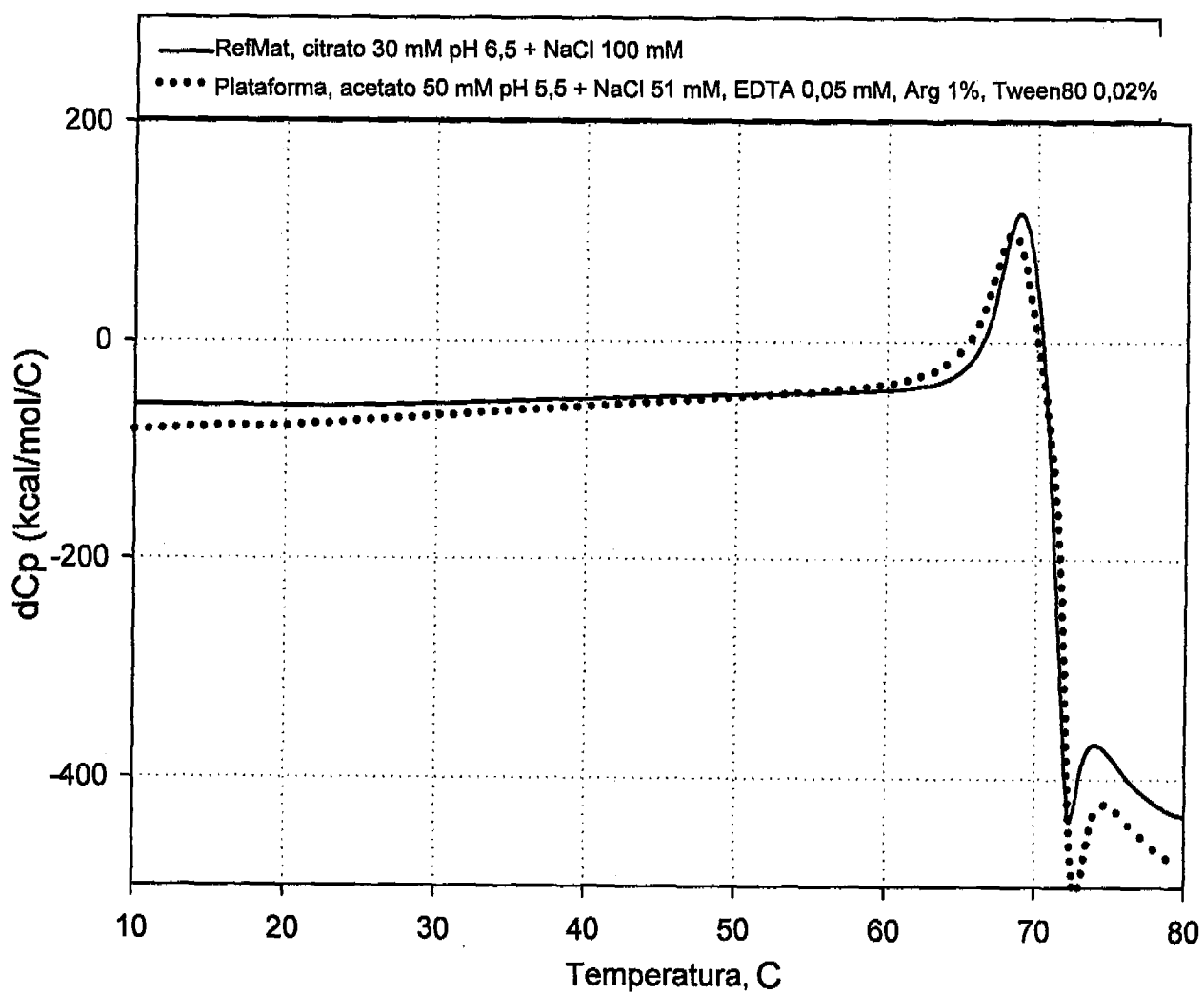
5 Figura 3: Barrido DSC

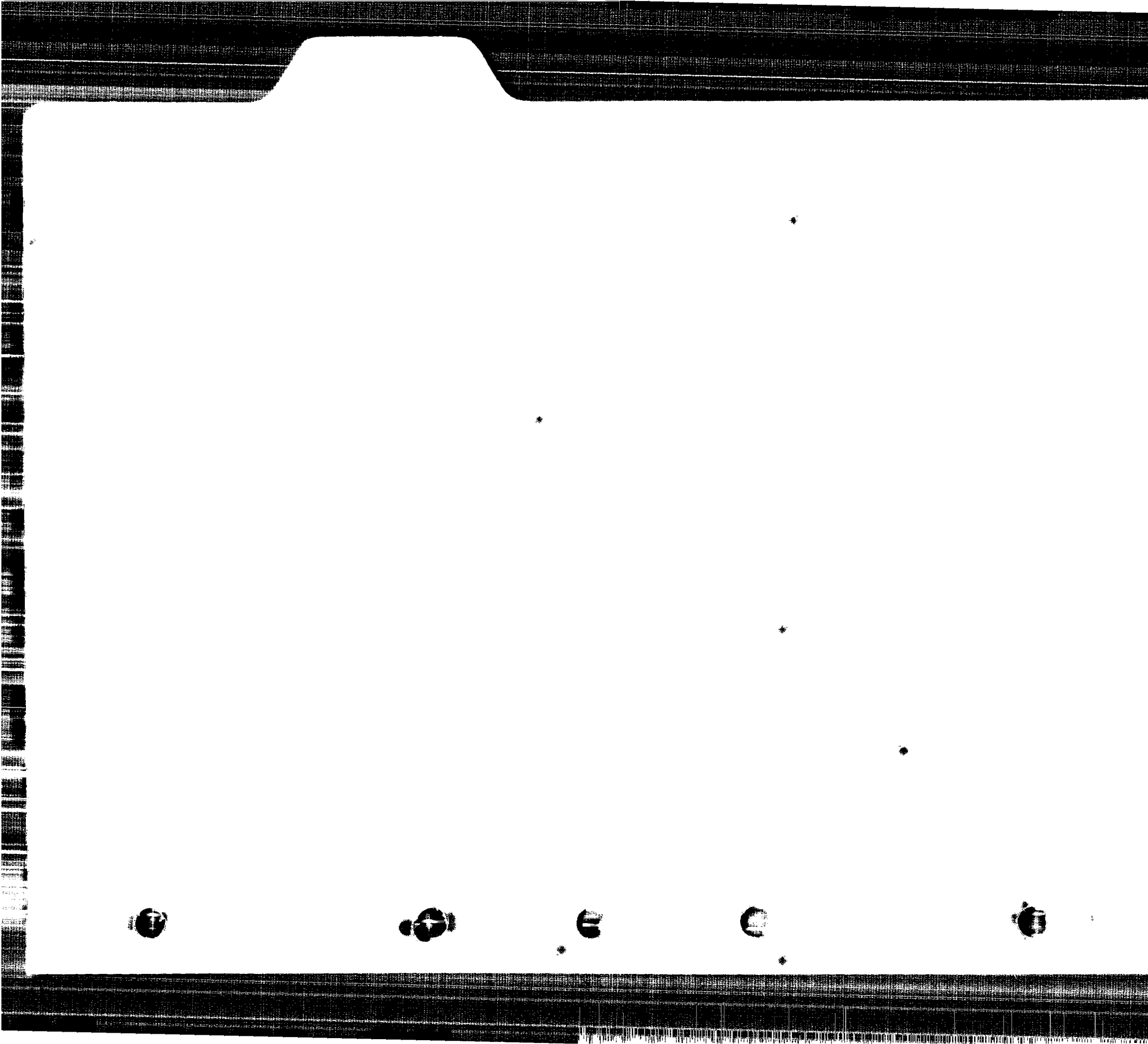
La transición de desdoblamiento se acopla con la agregación. Las  $T_m$  aparentes son:

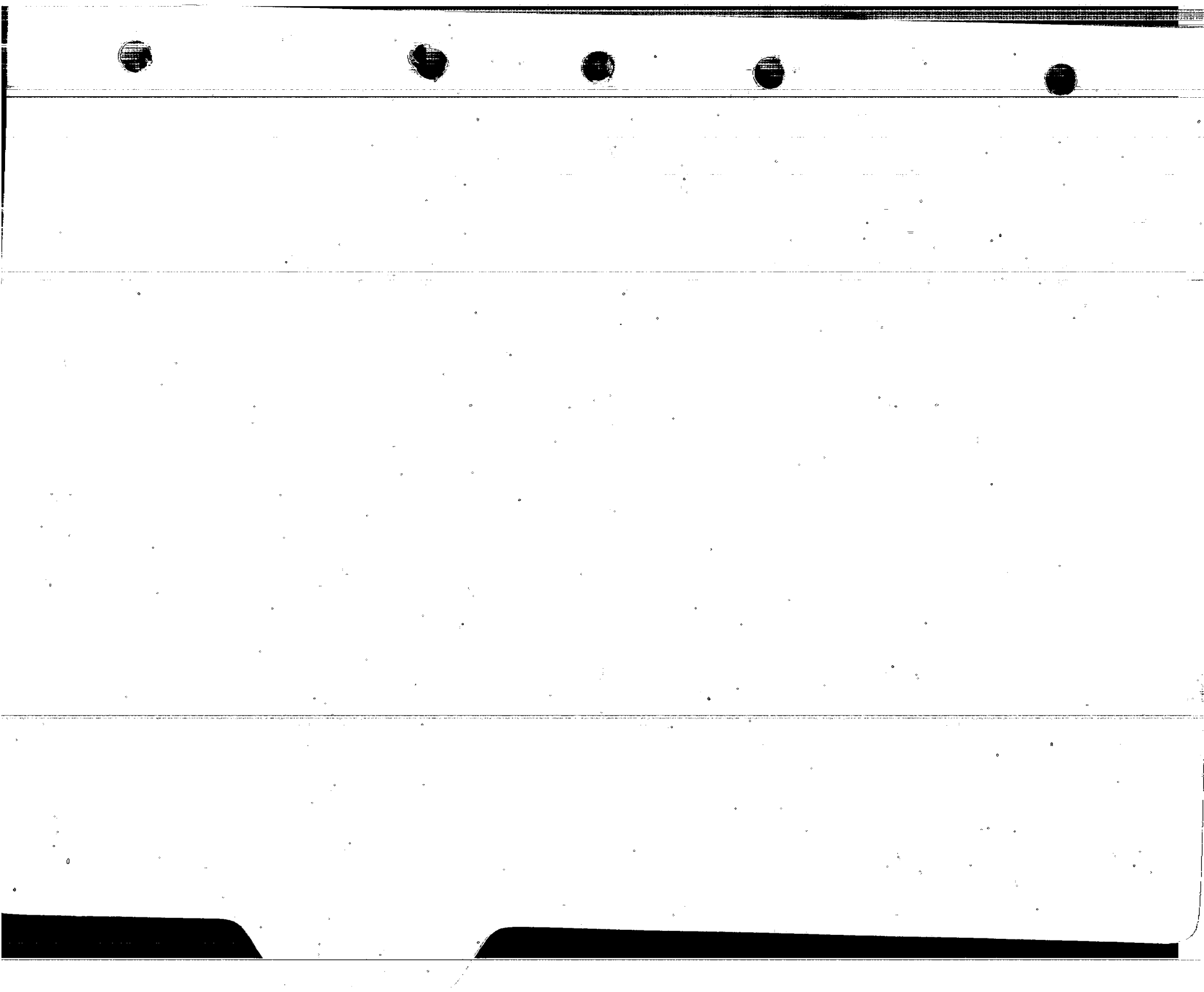
$T_m$ , plataforma =  $68,4^{\circ}\text{C}$

$T_m$ , estándar =  $68,8^{\circ}\text{C}$

10 Un  $\Delta T_m > 0,5^{\circ}\text{C}$  se considera significativo.







## PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/069125

From the INTERNATIONAL BUREAU

**PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

DERMOTT, Jonathan, M.  
Glaxosmithkline  
Corporate Intellectual Property, UW2220  
709 Swedeland Road, P.O.box 1539  
King of Prussia, PA 19406-0939  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

|                                                                   |                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>28 December 2009 (28.12.2009) | IMPORTANT NOTIFICATION                                                  |
| Applicant's or agent's file reference<br>PU62528                  |                                                                         |
| International application No.<br>PCT/US2008/069125                | International filing date (day/month/year)<br>03 July 2008 (03.07.2008) |

1. The following indications appeared on record concerning:  
☒ the applicant      ☐ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

|                                                                                                                                                 |                               |                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Name and Address<br>SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION<br>One Franklin Plaza<br>P.O. Box 7929<br>Philadelphia, PA 19101<br>United States of America | State of Nationality<br>US    | State of Residence<br>US |
|                                                                                                                                                 | Telephone No.<br>610-270-6887 |                          |
|                                                                                                                                                 | Facsimile No.<br>610-270-5090 |                          |
|                                                                                                                                                 | E-mail address                |                          |

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:  
☐ the person      ☒ the name      ☒ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

|                                                                                                                                              |                                                                               |                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Name and Address<br>GLAXOSMITHKLINE LLC<br>One Franklin Plaza<br>200 North 16th Street<br>Philadelphia, PA 19102<br>United States of America | State of Nationality<br>US                                                    | State of Residence<br>US |
|                                                                                                                                              | Telephone No.<br>610-270-6887                                                 |                          |
|                                                                                                                                              | Facsimile No.<br>610-270-5090                                                 |                          |
|                                                                                                                                              | E-mail address<br><input type="checkbox"/> Notifications by e-mail authorized |                          |

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:  
☒ the receiving Office      ☐ the International Preliminary Examining Authority  
☐ the International Searching Authority      ☒ the designated Offices concerned  
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search      ☐ the elected Offices concerned  
other: ☐

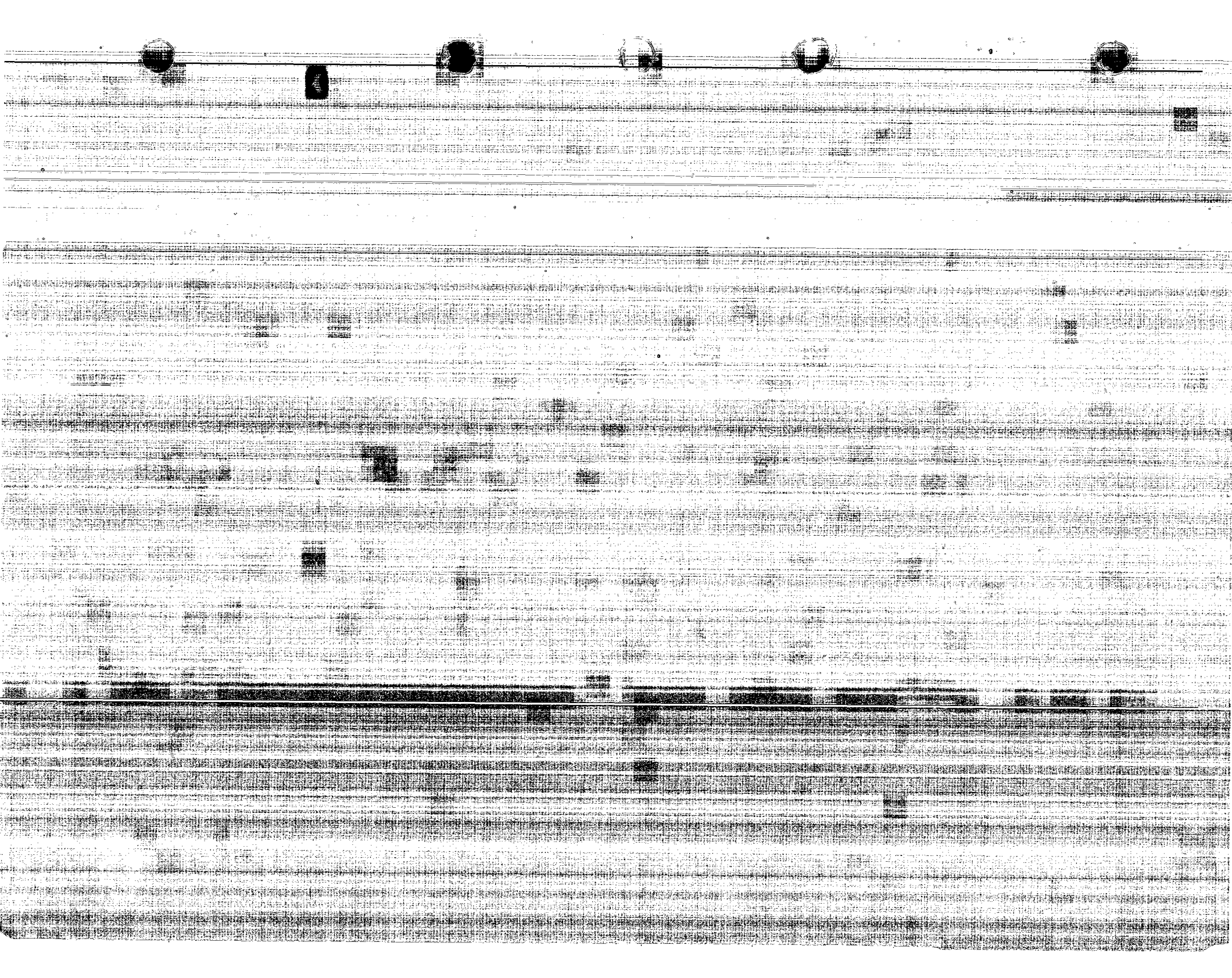
|                                                                                               |                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br>Marquis Catherine<br>e-mail pt03.pct@wipo.int<br>Telephone No. +41 22 338 74 03 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/EA4XC8TO0





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 08/69125

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/395 (2008.04)

USPC - 424/144.1

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
USPC: 424/144.1Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
USPC: 424/133.1; 424/178.1; 530/391.1 (see search terms below)Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
WEST (PGPB,USPT,EPAB,JPAB): CD20, monoclonal, antibody, lymphoma, argline free base, arginine, EDTA, polysorbate 80, pH, ofatumumab, humax, sodium acetate, sodium chloride, intravenous, subcutaneous, arginine free base, esp@canet: CD20, monoclonal;Google Scholar: CD20, monoclonal, antibody, arginine, base, EDTA, polysorbate

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                       | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | US 2006/0246004 A1 (ADAMS et al.) 2 November 2006 (02.11.2006) para [0002], [0025]-[0028], [0052], [0072], [0227], [0259], [0280]-[0281], [0302], [0316] | 1-25                  |
| Y         | US 4,816,401 A (TAUPIER et al.) 28 March 1989 (28.03.1989) abstract; col 5, ln 27; col 6, ln 24-28; col 6, ln 40-42                                      | 1-25                  |
| Y         | US 2006/0121032 A1 (DAHIYAT et al.) 8 June 2006 (08.06.2006) abstract; para [0187]                                                                       | 25                    |

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

\* 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 application or patent 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 September 2008 (15.09.2008)

Date of mailing of the international search report

22 SEP 2008

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

60  
60

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-149371 - 00000-0000

Fecha: 2009-12-30 17:43:38 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Ira. 11 PATENTEIYI Lve 378 FASENACIONALI  
Act 411 PRESENTACION Folios: 59



LISTA DE CHEQUEO  
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐  
☐  
☐  
☐  
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐  
☐  
☐  
☐

Indicación que se solicita una PCT

Copia de la solicitud en español tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐  
☐  
☐  
☐

Indicación que se solicita Diseño Industrial

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐  
☐  
☐  
☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Representación gráfica de un esquema de trazado

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐



Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 9 149371          |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2008/069125 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 06/02/2010        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | 4259              |

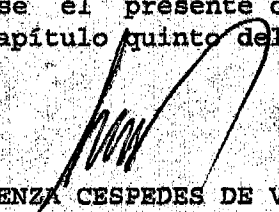
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se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

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

2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular Única 5.2.9)

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

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

  
ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL  
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha  
adpall 26 MAR. 2010

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000  
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070  
Call Center 6513240. Línea 01800-910165  
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co  
Bogotá D.C. Colombia



Bogotá,  
2020

Doctor(a)  
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO  
Apoderado(a) y/o Representante de  
GLAXOSMITHKLINE LLC

  
**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

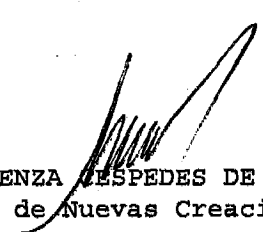
62  
62

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 9 149371          |
|            | Solicitud internacional    | PCT/US2008/069125 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 06/02/2010        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 378               |
|            | Actuación                  | 430               |
|            | Oficio No.                 | 4260              |

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

  
ALIX CARMENZA ESPEDES DE VERGEL  
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de  
fecha 26 MAR. 2010  
adpall

Al contestar favor indique el número  
de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000  
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070  
Call Center 6513240. Línea 01800-910165  
Web: [www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co) e-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co)  
Bogotá D.C. Colombia