



(12) **Øversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2234600 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Øversettelse publisert	2015.01.12
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.08.20
(86)	Europeisk søknadsnr	08864416.6
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.12.11
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.10.06
(30)	Prioritet	2007.12.21, EP, 07150335
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	RS
(73)	Innehaver	F. Hoffmann-La Roche AG, Grenzacherstraße 124, 4070 Basel, CH-Sveits
(72)	Oppfinner	ADLER, Michael, Woelflinstrasse 5c, 79104 Freiburg, DE-Tyskland MAHLER, Hanns-Christian, Freie Strasse 10, CH-4001 Basel, CH-Sveits WURTH, Christine, Theodor-Heuss-Strasse 19, 79539 Loerrach, DE-Tyskland
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Antistoff-formulering
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-98/56418 WO-A-2005/044859 WO-A-2006/044908 WO-A-2007/092772

Beskrivelse

Foreliggende oppfinnelse angår en anti-CD20 monoklonalt antistoff-formulering, fremgangsmåte for fremstilling av nevnte formulering og anvendelser av formuleringen.

Bakgrunn for oppfinnelsen

CD20-molekylet (også betegnet human B-lymfocytbegrenset differensierende antigen eller Bp35) er et hydrofobt transmembranprotein med en molekylvekt på omtrent 35 kD lokalisert på pre-B og modne B lymfocytter (Valentine et al. (1989) J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287; og Einfield et al. (1988) EMBO J. 7(3):711-717). CD20 er funnet på overflaten av mer enn 90 % av B-celler fra perifert blod eller lymfoide organer og blir uttrykt under tidlig pre-B-celleutvikling og forblir inntil differensiering til plasmaceller. CD20 er til stede på både normale B-celler så vel som maligne B-celler. Spesielt blir CD20 uttrykt på mer enn 90 % av non-Hodgkins B-celle lymfomer (NHL) (Anderson et al. (1984) Blood 63(6): 1424-1433)) men er ikke funnet på hematopoetiske stamceller, pro-B-celler, normale plasmaceller eller andre normale vev (Tedder et al. (1985) J, Immunol. 135(2):973- 979).

20

Den 85 aminosyrer lange karboksylterminale regionen av CD20-proteinet er lokalisert inne i cytoplasma. Lengden av denne regionen står i kontrast til den av andre B-cellespesifikke overflatestrukturer slik som IgM, IgD og IgG tunge kjeder eller histokompatibilitetsantigener klasse II a eller β -kjeder, som har relativt korte intracytoplasmatiske regioner på 3, 3, 28, 15 og 16 aminosyrer, henholdsvis (Komaromy et al. (1983) NAR 11:6775-6785). Av de siste 61 karboksylterminale aminosyrene er 21 sure rester, mens bare 2 er basiske, hvilket indikerer at denne regionen har en sterk netto negativ ladning. GenBank Aksesjonsnummer er NP-690605. Det er antatt at CD20 kunne være involvert i regulering av (et) tidlig(e) trinn i aktiverings- og differensieringsprosessen av B-celler (Tedder et al. (1986) Eur. J. Immunol. 25 16:881-887) og kunne fungere som en kalsiumionekanal (Tedder et al. (1990) J. Cell. Biochem. 14D: 195).

30

Det finnes to forskjellige typer av anti-CD20 antistoffer som skiller seg betydelig fra hverandre i deres metode for CD20-binding og biologiske aktiviteter (Cragg, M.S., et al, Blood, 103 (2004) 2738-2743; og Cragg, M.S., et al, Blood, 101 (2003) 1045-1051). Type I antistoffer, som Rituximab, er potent i komplementmediert

35

cytotoksisitet, mens type II antistoffer, som Tositumomab (Bexxar[®], B1), 11B8 og AT80, effektivt initierer dreping av målceller via kaspase-uavhengig apoptose med ledsagende fosfatidylserin-eksponering.

- 5 Felles trekk for type I og type II anti-CD20 antistoffer er oppsummert i Tabell 1.

Tabell 1: Egenskaper av type I og type II anti-CD20 antistoffer

type I anti-CD20 antistoffer	type II anti-CD20 antistoffer
type I CD20 epitop	type II CD20 epitop
Lokaliserer CD20 til "lipid raft"	Lokaliserer ikke CD20 til "lipid-flåter" (lipid rafts)
Økt CDC (dersom IgG1 isotype)	Redusert CDC (dersom IgG1 isotype)
ADCC-aktivitet (dersom IgG1 isotype)	ADCC-aktivitet (dersom IgG1 isotype)
Full bindingskapasitet	Redusert bindingskapasitet
Homotypisk aggregering	Sterkere homotypisk aggregering
Apoptoseinduksjon ved kryssbinding	Sterk induksjon av celledød uten kryssbinding

10 **Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen**

Betegnelsen "antistoff" omfatter de forskjellige formene for antistoffer omfattende men ikke begrenset til hele antistoffer, humane antistoffer, humaniserte antistoffer og genetisk konstruerte antistoffer som monoklonale antistoffer, kimære antistoffer eller rekombinante antistoffer så vel som fragmenter av slike antistoffer så lenge de karakteristiske egenskapene ifølge oppfinnelsen er beholdt.

"Antistofffragmenter" omfatter en del av et fullengde antistoff, generelt minst den antigenbindende delen eller den variable regionen derav. Eksempler på antistofffragmenter omfatter diabodier, enkeltkjede antistoffmolekyler, immuntoksiner og multispesifikke antistoffer dannet fra antistofffragmenter. I tillegg omfatter antistofffragmenter enkeltkjede polypeptider som har egenskapene av en VH-kjede, dvs. er i stand til å settes sammen med en VL-kjede eller av en VL-kjede som binder til CD20-antigenet, dvs. er i stand til å settes sammen med en VH-kjede til en funksjonell antigenbindende "lomme".

"Antistofffragmenter" omfatter også slike fragmenter som per se er ikke er i stand til å tilveiebringe effektorfunksjoner (ADCC/CDC) men tilveiebringer denne funksjonen på en måte i henhold til oppfinnelsen etter å ha blitt kombinert med passende antistoff konstant(e) domene(r).

5

Betegnelsene "monoklonalt antistoff" eller "monoklonalt antistoffpreparat" som anvendt her refererer til en fremstilling av antistoffmolekyler av en enkel aminosyre sammensetning. Følgelig angir betegnelsen "humant monoklonalt antistoff" antistoffer som oppviser en enkelt bindingsspesifisitet som har variable og konstante regioner avledet fra human kjønnselle immunglobulinsekvenser. I én utførelsesform er de humane monoklonale antistoffene produsert av et hybridom som omfatter en B-celle oppnådd fra et transgent ikke-humant dyr, f.eks. en transgen mus, som har et genom omfattende et humant tungkjede transgen og et humant lett kjede transgen fusjonert til en immortalisert celle.

15

Betegnelsen "kimært antistoff" angir et monoklonalt antistoff omfattende en variabel region, dvs. bindende region, fra én kilde eller art og minst en del av en konstant region avledet fra en ulik kilde eller art, vanligvis fremstilt ved rekombinant DNA-teknikker. Kimære antistoffer omfattende en murin variabel region og en human konstant region er spesielt foretrukket. Slike murine/humane kimære antistoffer er produktet av uttrykte immunglobulingener omfattende DNA-segmenter som koder for murin immunglobulin variabel regioner og DNA-segmenter som koder for human immunglobulin konstante regioner. Andre former for "kimære antistoffer" omfattet av foreliggende oppfinnelse er de hvor klassen eller underklassen er modifisert eller endret fra den for det opprinnelige antistoffet. Slike "kimære" antistoffer er også referert til som "klasse-switchede antistoffer." Metoder for fremstilling av kimære antistoffer omfatter konvensjonelle rekombinant DNA-og gen transfeksjonsteknikker nå velkjent på området. Se, f.eks. Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238 og US 5,204,244.

30

Betegnelsen "humanisert antistoff" angir antistoffer hvor rammeverk ("framework")-regionen eller "komplementaritetsbestemmende regioner" (CDR) er modifisert til å omfatte CDR'er fra et immunglobulin med ulik spesifisitet sammenlignet med den av utgangs-immunglobulinet. I en foretrukket utførelsesform er en murin CDR podet til rammeverk ("framework")-regionen av et humant antistoff for å fremstille det "humaniserte antistoffet." Se, f.eks. Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; og Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Spesielt foretrukne

35

CDR'er svarer til dem som representerer sekvenser som gjenkjenner antigenene angitt ovenfor for kimære og bifunksjonelle antistoffer.

5 Betegnelsen "humant antistoff", som anvendt her, skal omfatte antistoffer som har variable og konstante regioner avledet fra human kjønnselle immunglobulin-sekvenser. Humane antistoffer er velkjent på området (van Dijk, M.A. og van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374). Basert på slik teknologi kan humane antistoffer mot mange forskjellige mål produseres. Eksempler på humane antistoffer er for eksempel beskrevet i Kellermann, S. A., et al., Curr Opin Biotechnol.
10 13 (2002) 593-597.

Betegnelsen "rekombinant humant antistoff", som anvendt her, skal omfatte alle humane antistoffer som blir fremstilt, uttrykt, dannet eller isolert ved rekombinante metoder, så som antistoffer isolert fra en vertscelle slik som en NS0 eller CHO-celle
15 eller fra et dyr (f.eks. en mus) som er transgent for humane immunglobulin-gener eller antistoffer uttrykt ved anvendelse av en rekombinant ekspresjonsvektor transfektert inn i en vertscelle. Slike rekombinante humane antistoffer har variable og konstante regioner avledet fra human kjønnselle immunglobulinsekvenser i en rearrangert form. De rekombinante humane antistoffene ifølge oppfinnelsen har blitt
20 underlagt *in vivo* somatisk hypermutasjon. Følgelig er aminosyresekvensene av VH og VL-regionene av de rekombinante antistoffene sekvenser som, selv om de er avledet fra og relatert til human kjønnselle VH og VL-sekvenser, kanskje ikke naturlig finnes innenfor det humane antistoff kjønnselle-repertoaret *in vivo*.

25 Som anvendt her angir "spesifikt binder" eller "binder spesifikt til" et antistoff som spesifikt binder til CD20-antigenet. Fortrinnsvis har bindingsaffiniteten en KD-verdi på 10^{-9} mol/l eller lavere (f.eks. 10^{-10} mol/l), fortrinnsvis en KD-verdi på 10^{-10} mol/l eller lavere (f.eks. 10^{-12} mol/l). Bindingsaffiniteten blir bestemt med et standard bindingsforsøk, så som overflate plasmon resonans-teknikk (Biacore®).

30

Betegnelsen "nukleinsyremolekyl", som anvendt her, skal omfatte DNA-molekyler og RNA-molekyler. Et nukleinsyremolekyl kan være enkeltrådet eller dobbeltrådet, men er fortrinnsvis dobbeltrådet DNA.

35 De "konstante domenene" er ikke involvert direkte i binding av antistoffet til et antigen men er involvert i effektorfunksjonene (ADCC, komplement-binding og CDC).

Den "variable regionen" (variabel region av en lett kjede (VL), variabel region av en tungkjede (VH)) som anvendt her betyr hvert av paret av lette og tunge kjeder som er involvert direkte i binding av antistoffet til antigenet. Domenene av variable humane lette og tunge kjeder har samme generelle struktur og hvert domene omfatter fire rammeverk ("framework") (FR)-regioner hvis sekvenser er svært konserverte, forbundet av tre "hypervariable regioner" (eller komplementaritetsbestemmende regioner, CDR'er). Rammeverk-regionene inntar en b-plate konformasjon og CDR'ene kan danne løkker som forbinder b-plate strukturen. CDR'ene i hver kjede blir holdt i deres tredimensjonale struktur av rammeverk ("framework")-regionene og danner sammen med CDR'ene fra den andre kjeden det antigenbindende setet. Antistoff tung- og lett kjede CDR3-regionene spiller en spesielt viktig rolle ved bindingsspesifisiteten/affiniteten av antistoffene ifølge oppfinnelsen og tilveiebringer derfor et ytterligere formål ifølge oppfinnelsen.

Betegnelsene "hypervariable region" eller "antigenbindende del av et antistoff" når anvendt her refererer til de aminosyrerestene av et antistoff som er ansvarlig for antigen-binding. Den hypervariable regionen omfatter aminosyrerester fra de "komplementaritetsbestemmende regionene" eller "CDR'er". Rammeverk ("framework")- eller "FR"-regioner er de variabelt domene-regionene som er forskjellig fra hypervariable region-restene som her definert. Derfor omfatter de lette og tunge kjedene av et antistoff fra N- til C-terminal ende domene FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 og FR4. Spesielt er CDR3 av tungkjeden den regionen som bidrar mest til antigenbinding. CDR og FR-regioner blir bestemt i henhold til standarddefinisjonen ifølge Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) og/eller disse restene fra en "hypervariable løkke".

Betegnelsene "CD20" og "CD20-antigen" blir anvendt om hverandre her og omfatter hvilke som helst varianter, isoformer og artshomologer av human CD20 som naturlig blir uttrykt av celler eller blir uttrykt på celler transfektert med CD20-genet. Binding av et antistoff ifølge oppfinnelsen til CD20-antigenet medierer dreping av celler som uttrykker CD20 (f.eks. en tumorcelle) ved å inaktivere CD20. Dreping av cellene som uttrykker CD20 kan finne sted ved én eller flere av følgende mekanismer:

Synonymer for CD20, som kjent på området, omfatter B-lymfocyt antigen CD20, B-lymfocyt overflateantigen B1, Leu-16, Bp35, BM5 og LF5.

Betegnelsen "anti-CD20 antistoff" ifølge oppfinnelsen er et antistoff som binder spesifikt til CD20-antigen. Avhengig av bindingsegenskaper og biologiske aktiviteter av anti-CD20 antistoffer mot CD20-antigenet, kan en skille mellom to typer av anti-CD20 antistoffer (type I og type II anti-CD20 antistoffer) i henhold til Cragg, M.S., et al, Blood 103 (2004) 2738-2743; og Cragg, M.S., et al Blood 101 (2003) 1045-1051, se Tabell 2.

Tabell 2: Egenskaper av type I og type II anti-CD20 antistoffer

type I anti-CD20-antistoffer	type II anti-CD20-antistoffer
type I CD20-epitop	type II CD20-epitop
Lokaliserer CD20 til "lipid raft"	Lokaliserer ikke CD20 til lipid-flåte
Økt CDC (hvis IgG1-isotype)	Redusert CDC (hvis IgG1-isotype)
ADCC-aktivitet (hvis IgG1-isotype)	ADCC aktivitet (hvis IgG1-isotype)
Full bindingskapasitet	Redusert bindingskapasitet
Homotypisk aggregering	Sterkere homotypisk aggregering
Apoptoseinduksjon ved kryssbinding	Sterk induksjon av celledød uten kryssbinding

En essensiell egenskap av type I og type II anti-CD20-antistoff er deres bindingsmåte. Følgelig kan type I og type II anti-CD20 antistoff klassifiseres ved forholdet mellom bindingskapasitetene til CD20 på Raji-celler (ATCC-nr. CCL-86) ved nevnte anti-CD20 antistoff sammenlignet med rituximab.

Som anvendt her kan "anti-CD20 antistoff" være enten et type I eller type II antistoff. Fortrinnsvis er det et type II-antistoff.

Type I anti-CD20 antistoffene har et forhold mellom bindingskapasitetene til CD20 på Raji-celler (ATCC-nr. CCL-86) ved nevnte anti-CD20 antistoff sammenlignet med rituximab på 0,8 til 1,2, fortrinnsvis på 0,9 til 1,1. Eksempler på slike type I anti-CD20-antistoffer omfatter f.eks. rituximab, (WO94/11026), 1F5 IgG2a (ECACC, hybridom; Press et al., Blood 69/2:584-591 (1987)), HI47 IgG3 (ECACC, hybridom), 2C6 IgG1 (som beskrevet i WO2005/103081), 2F2 IgG1 (som beskrevet i WO 2004/035607 og WO2005/103081) og 2H7 IgG1 (som beskrevet i WO 2004/056312). Fortrinnsvis er nevnte type I anti-CD20 antistoff et monoklonalt antistoff som binder til samme epitop som rituximab. Type II anti-CD20-antistoffene har et forhold mellom bindingskapasitetene til CD20 på Raji-celler (ATCC-nr. CCL-86) ved nevnte anti-CD20-

antistoff sammenlignet med rituximab på 0,3 til 0,6, fortrinnsvis på 0,35 til 0,55, mer foretrukket 0,4 til 0,5. Eksempler på slike type II anti-CD20 antistoffer omfatter f.eks. tositumomab (B1 IgG2a), humanisert B-Ly1-antistoff IgG1 (et kimært humanisert IgG1 antistoff som beskrevet i WO2005/044859), 11B8 IgG1 (som beskrevet i WO 2004/035607) og AT80 IgG1. Fortrinnsvis er nevnte type II anti-CD20 antistoff et monoklonalt antistoff som binder til samme epitop som humanisert B-Ly1-antistoff (som beskrevet i WO2005/044859).

"Forholdet mellom bindingskapasitetene til CD20 på Raji-celler (ATCC-nr. CCL-86) ved et anti-CD20 antistoff sammenlignet med rituximab" blir bestemt ved direkte immunfluorescensmåling (gjennomsnittlig fluorescerende intensiteter (MFI) blir målt) ved anvendelse av nevnte anti-CD20 antistoff konjugert med Cy5 og rituximab konjugert med Cy5 i en FACSArray (Becton Dickinson) med Raji-celler (ATCC-nr. CCL-86), som beskrevet i Eksempel nr. 2 og beregnet som følger:

15

Forholdet mellom bindingskapasiteter til CD20 på Raji-celler (ATCC- nr. CCL-86) =

$$\frac{\text{MFI(Cy5-anti-CD20 antistoff)}}{\text{MFI(Cy5-rituximab)}} \times \frac{\text{Cy5-merking forhold (Cy5-rituximab)}}{\text{Cy5-merking forhold (Cy5-anti-CD20 antistoff)}}$$

20

MFI er gjennomsnittlig fluorescerende intensitet. "Cy5-merkingsforhold" som anvendt her betyr antall Cy5-merkemolekyler pr. molekyl antistoff.

25

Typisk har nevnte type I anti-CD20 antistoff et forhold mellom bindingskapasitetene til CD20 på Raji-celler (ATCC-nr. CCL-86) ved nevnte første anti-CD20 antistoff sammenlignet med rituximab på 0,8 til 1,2, fortrinnsvis 0,9 til 1,1.

30

Typisk har nevnte type II anti-CD20 antistoff et forhold mellom bindingskapasitetene til CD20 på Raji-celler (ATCC-nr. CCL-86) ved nevnte andre anti-CD20 antistoff sammenlignet med rituximab på 0,3 til 0,6, fortrinnsvis 0,35 til 0,55, mer foretrukket 0,4 til 0,5.

I en foretrukket utførelsesform har nevnte type II anti-CD20 antistoff, fortrinnsvis et humanisert B-Ly1-antistoff, økt antistoffavhengig cellulær cytotoxissitet (ADCC).

35

Med "antistoff som har økt antistoffavhengig cellulær cytotoxissitet (ADCC)" menes et antistoff, som denne betegnelsen er definert her, som har økt ADCC som bestemt ved

hvilken som helst egnet metode kjent for fagfolk på området. Ett alminnelig anerkjent *in vitro* ADCC-forsøk er som følger:

- 1) forsøket anvender målceller som er kjent å uttrykke mål-antigenet gjenkjent av den antigenbindende regionen av antistoffet;
- 2) forsøket anvender humane mononukleære celler fra perifert blod (PBMC), isolert fra blod fra en tilfeldig valgt frisk donor, som effektorceller;
- 3) forsøket blir utført i henhold til følgende protokoll:
 - i) PBMC blir isolert ved anvendelse av standard tetthetssentrifugeringsmetoder og blir suspendert ved 5×10^6 celler/ml i RPMI celledyrkningsmedium;
 - ii) målcellene blir dyrket ved standard vevskulturmetoder, høstet fra den eksponensielle vekstfasen med en levedyktighet høyere enn 90 %, vasket i RPMI celledyrkningsmedium, merket med 100 mikrocurie av ^{125}I -, vasket to ganger med celledyrkningsmedium og resuspendert i celledyrkningsmedium med en tetthet på 1×10^5 celler/ml;
 - iii) 100 mikroliter av den endelige målcellesuspensjonen ovenfor blir overført til hver brønn av en 96-brønns mikrotiterplate;
 - iv) antistoffet blir seriefortynnet fra 4000 ng/ml til 0,04 ng/ml i celledyrkningsmedium og 50 mikroliter av de resulterende antistoffløsningene blir tilsatt til målcellene i den 96-brønns mikrotiterplaten, for testing in triplo av forskjellige antistoffkonsentrasjoner som dekker hele konsentrasjonsområdet ovenfor;
 - v) for kontroller av maksimal frigjøring (MR), mottok 3 ytterligere brønner i platen inneholdende de merkede målcellene, 50 mikroliter av en 2 % (VN) vandig løsning av ikke-ionisk detergent (Nonidet, Sigma, St. Louis), istedenfor antistoffløsningen (punkt iv ovenfor);
 - vi) for kontroller av spontan frigjøring (SR), mottok 3 ytterligere brønner i platen inneholdende de merkede målcellene, 50 mikroliter RPMI celledyrkningsmedium istedenfor antistoffløsningen (punkt iv ovenfor);
 - vii) den 96-brønns mikrotiterplaten blir deretter sentrifugert ved $50 \times g$ i 1 minutt og inkubert i 1 time ved 4°C ;
 - viii) 50 mikroliter av PBMC-suspensjonen (punkt i ovenfor) blir tilsatt til hver brønn, hvilket gir et effektor:målcelle-forhold på 25:1 og platene blir plassert i en inkubator under 5 % CO_2 -atmosfære ved 37°C i 4 timer;
 - ix) den cellefrie supernatanten fra hver brønn blir høstet og eksperimentelt frigjort radioaktivitet (ER) blir kvantifisert ved anvendelse av en gammateller;

x) prosentdelen av spesifikk lysis blir beregnet for hver antistoffkonsentrasjon i henhold til formelen $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, hvor ER er gjennomsnittlig radioaktivitet kvantifisert (se punkt ix ovenfor) for denne antistoffkonsentrasjonen, MR er gjennomsnittlig radioaktivitet kvantifisert (se punkt ix ovenfor) for MR-kontrollene (se punkt V ovenfor) og SR er gjennomsnittlig radioaktivitet kvantifisert (se punkt ix ovenfor) for SR-kontrollene (se punkt vi ovenfor);

4) "økt ADCC" er definert som enten en økning i maksimal prosentdel av spesifikk lysis observert innenfor konsentrasjonsområdet for antistoff testet ovenfor og/eller en reduksjon i konsentrasjonen av antistoff nødvendig for å oppnå halvparten av maksimal prosentdel av spesifikk lysis observert innenfor konsentrasjonsområdet for antistoff testet ovenfor. Økningen i ADCC er i forhold til ADCC, målt med ovennevnte analyse, mediert ved samme antistoff, produsert av samme type vertsceller, ved anvendelse av samme standard produksjons-, rensnings-, formulerings- og lagringsmetoder, som er kjent for fagfolk på området, men som ikke har blitt produsert av vertsceller konstruert til å overuttrykke GnTIII.

Nevnte "økt ADCC" kan oppnås ved glykomodifisering ("glycoengineering") av nevnte antistoffer, det innebærer å fremme nevnte naturlige, cellemedierte effektorfunksjoner av monoklonale antistoffer ved utvikling av deres oligosakkarid-komponent som beskrevet i Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999) og U.S. Pat. nr. 6,602,684.

Betegnelsen "komplementavhengig cytotoksitet (CDC)" refererer til lysis av humane tumor-målceller ved antistoffet ifølge oppfinnelsen i nærvær av komplement. CDC blir målt fortrinnsvis ved behandling av en fremstilling av CD20-uttrykkende celler med et anti-CD20 antistoff ifølge oppfinnelsen i nærvær av komplement. CDC er funnet hvis antistoffet induserer ved en konsentrasjon på 100 nM lysis (celledød) av 20 % eller mer av tumorcellene etter 4 timer. Forsøket blir fortrinnsvis utført med ^{51}Cr eller Eu-merkede tumorceller og måling av frigjort ^{51}Cr eller Eu. Kontroller omfatter inkubering av tumor-målceller med komplement men uten antistoffet.

Type I og type II anti-CD20-antistoffer av IgG 1-isotype fremviser typisk karakteristiske CDC-egenskaper. Type I anti-CD20-antistoffer har økt CDC (dersom IgG1 isotype) og type II anti-CD20 antistoffer har en redusert CDC (dersom IgG1 isotype) sammenlignet med hverandre. Fortrinnsvis er både type I og type II anti-CD20 antistoffer IgG1 isotype antistoffer.

"Rituximab"-antistoffet er et genetisk konstruert kimært humant gamma 1 murin konstant domene-inneholdende monoklonalt antistoff rettet mot det humane CD20-antigenet. Dette kimære antistoffet inneholder human gamma 1 konstante domener og er identifisert ved navnet "C2B8" i WO94/11026 (Anderson et. al.). Rituximab er godkjent for behandling av pasienter med residiverende eller refraktært lavgradig eller follikulært, CD20 positiv, B-celle non-Hodgkins lymfom. *In vitro* virkningsmekanisme-studier har vist at rituximab oppviser human komplementavhengig cytotoxiskitet (CDC) (Reff et. al, Blood 83(2): 435-445 (1994)). I tillegg oppviser det betydelig aktivitet i analyse som måler antistoffavhengig cellulær cytotoxiskitet (ADCC).

Betegnelsen "humanisert B-Ly1-antistoff" refererer til humanisert B-Ly1 antistoff som beskrevet i WO2005/044859, som ble oppnådd fra det murine monoklonale anti-CD20 antistoffet B-Ly1 (variabel region av murin tung kjede (VH): SEKV ID NR: 1; variabel region av murin lett kjede (VL): SEKV ID NR: 2- se Poppema, S. og Visser, L., Biotest Bulletin 3: 131-139 (1987);) ved kimerisering med et humant konstant domene fra IgG1 og følgende humanisering (se WO2005/044859). Disse "humaniserte B-Ly1-antistoffene" er beskrevet i detalj i WO2005/ 044859.

Videre er det humaniserte B-Ly1 antistoffet fortrinnsvis et IgG1-antistoff. Fortrinnsvis er slike humaniserte B-Ly1-antistoffer glykomodifisert (GE) i Fc-regionen i henhold til metodene beskrevet i WO2005/044859, WO 2004/065540, Umana, P. et al., Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999) og WO 99/154342. De fleste glykomodifiserte humaniserte B-Ly1-antistoffer har endret glykosyleringsmønster i Fc-regionen, fortrinnsvis har de et redusert nivå av fukose-rester. Fortrinnsvis er minst 40 % eller mer (i én utførelsesform mellom 40 % og 60 %, i en annen utførelsesform minst 50 % og i enda en annen utførelsesform minst 70 % eller mer) av oligosakkaridene av Fc-regionen ikke-fukosylert. Videre er oligosakkaridene av Fc-regionen fortrinnsvis todelte ("bisected"). Det "humaniserte B-Ly1-antistoffet" omfatter VH B-HH6 og VL B-KV1 fra WO2005/044859. Som anvendt her blir nevnte antistoff også referert til som "HuMab<CD20>". I en annen mest foretrukket utførelsesform har nevnte antistoff et redusert nivå av fukose-rester som definert ovenfor og/eller oligosakkaridene av Fc-regionen er mest foretrukket todelte ("bisected"). I enda en annen mest foretrukket utførelsesform oppviser nevnte antistoff økt ADCC som definert her.

35

Oligosakkarid-komponenten kan i betydelig grad påvirke egenskaper relevant for effektiviteten av et terapeutisk glykoprotein, omfattende fysisk stabilitet, resistens

mot angrep fra proteaser, interaksjoner med immunsystemet, farmakokinetikk og spesifikk biologisk aktivitet. Slike egenskaper kan avhenge ikke bare av nærvær eller fravær, men også av de spesifikke strukturene, av oligosakkarider. Noen generaliseringer mellom oligosakkaridstruktur og glykoproteinfunksjon kan foretas.

5 For eksempel medierer visse oligosakkaridstrukturer rask utskilling av glykoproteinet fra blodbanen gjennom interaksjoner med spesifikke karbohydrat bindingsproteiner, mens andre kan bli bundet av antistoffer og utløse uønskede immunreaksjoner. (Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996)).

10 Pattedyrceller er foretrukne verter for produksjon av terapeutiske glykoproteiner, på grunn av deres evne til å glykosylere proteiner i den mest compatible formen for human anvendelse. (Cumming et al., Glycobiology 1:115-30 (1991); Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:975-81 (1996)). Bakterier glykosylerer svært sjelden proteiner og gir på samme måte som andre typer av vanlige verter, så som gjær, filamentøse

15 sopper, insekt- og planteceller, glykosyleringsmønstre forbundet med rask utskilling fra blodbanen, uønskede immun-interaksjoner og i noen spesifikke tilfeller, redusert biologisk aktivitet. Blant pattedyrceller har ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO-celler) blitt mest vanlig anvendt i de siste to tiårene. I tillegg til å gi egnede glykosyleringsmønstre, muliggjør disse cellene gjennomført dannelsen av genetisk

20 stabile, svært produktive klonale cellelinjer. De kan dyrkes til høy tetthet i enkle bioreaktorer ved anvendelse av serumfrie media og tillater utvikling av sikre og reproducerbare bioprosesser. Andre vanlig anvendte dyreceller omfatter nyreceller fra babyhamster (BHK-celler), NSO- og SP2/0-mus myelomceller. Mer nylig har produksjon fra transgene dyr også blitt testet. (Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14:

25 975-981 (1996)).

Alle antistoffer inneholder karbohydratstrukturer ved konserverte stillinger i tung kjede konstante regioner, hvor hver isotype har en distinkt rekke av N-bundne karbohydratstrukturer, hvilken variabilitet påvirker sammensetting, sekresjon eller

30 funksjonell aktivitet av proteinet. (Wright, A. og Monison, S. L., Trends Biotech. 15: 26-32 (1997)). Strukturen av de tilknyttede N-bundne karbohydratene varierer betraktelig, avhengig av graden av prosessering og kan omfatte høy mannose, multippelt forgrenede så vel som biantennary komplekse oligosakkarider. (Wright, A. og Morrison, S. L., Trends Biotech. 15: 26-32 (1997)). Typisk er der heterogen

35 prosessering av kjerneoligosakkaridstrukturene forbundet ved et spesielt glykosyleringssete slik at selv monoklonale antistoffer eksisterer som multiple glykoformer. Likeledes er det vist at store forskjeller i glykosylering av antistoff

forekommer mellom cellelinjer og det er til og med sett mindre forskjeller for en gitt cellelinje dyrket under forskjellige dyrkingsbetingelser. (Lifely, M. R. et al., *Glycobiology* 5(8):813-22 (1995)).

5 En måte å oppnå store økninger i potens på, samtidig som det opprettholdes en enkel produksjonsprosess og det potensielt unngås betydelige, uønskede bivirkninger, er å forbedre de naturlige, cellemedierte effektorfunksjonene av monoklonale antistoffer ved utvikling av deres oligosakkaridkomponent som beskrevet i Umana, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999) og U.S. Pat. nr. 6,602,684. IgG1 type
10 antistoffer, de vanligst anvendte antistoffene ved immunterapi mot kreft, er glykoproteiner som har et konserverte N-bundet glykosyleringssete ved Asn297 i hvert CH2-domene. De to komplekse biantennary oligosakkaridene bundet til Asn297 er nedgravd mellom CH2-domenene, og danner omfattende kontakter med polypeptidryggraden, og deres tilstedeværelse er essensiell for at antistoffet skal
15 mediere effektorfunksjoner slik som antistoffavhengig cellulær cytotoxiskitet (ADCC) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5: 813-822 (1995); Jefferis, R., et al., *Immunol. Rev.* 163: 59-76 (1998); Wright, A. og Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15: 26-32 (1997)).

20 Den ble tidligere vist at overekspresjon i ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO-celler) av $\beta(1,4)$ -N-acetylglukosaminyltransferase I11 ("GnTIII17y), en glykosyltransferase som katalyserer dannelsen av todelte ("bisected") oligosakkarider, betydelig øker *in vitro* ADCC-aktiviteten av et anti-nevroblastom kimært monoklonalt antistoff (chCE7) produsert av de konstruerte CHO-cellene. (Se Umana, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:
25 176-180 (1999); og WO 99/154342, idet hele innholdet i disse er omfattet her i sin helhet ved referanse). Antistoffet chCE7 tilhører til en stor klasse av ukonjugerte monoklonale antistoffer som har høy tumoraffinitet og spesifisitet, men har for liten potens til å være klinisk anvendelige når de blir produsert i standard industrielle cellelinjer som mangler GnTIII enzymet (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17:
30 176-180 (1999)). Denne studien var den første som viste at store økninger av ADCC-aktivitet kunne oppnås ved å konstruere antistoffproduserende celler til å uttrykke GnTIII, hvilket også førte til en økning i proporsjonen av konstant region (Fc)-assosierte, todelte ("bisected") oligosakkarider, omfattende todelte, ikke-fucosylerte oligosakkarider, over nivåene funnet i naturlig forekommende antistoffer.

35

Betegnelsen "ekspresjon av CD20"-antigenet er ment å indikere et signifikant ekspresjonsnivå av CD20-antigenet i en celle, fortrinnsvis på celleoverflaten av en T-

eller B- celle, mer foretrukket en B-celle, fra en tumor eller kreft, henholdsvis, fortrinnsvis en ikke-fast tumor. Pasienter som har "CD20-uttrykkende kreft" kan bestemmes ved standardanalyser kjent på området. "Ekspresjon av CD20"-antigenet er også foretrukket ment å indikere et betydelig ekspresjonsnivå av CD20-antigenet i
 5 en celle, fortrinnsvis på celleoverflaten av en T- eller B-celle, mer foretrukket en B-celle, ved en autoimmun sykdom. F.eks. blir CD20 antigenekspresjon målt ved anvendelse av immunhistokjemisk (IHC) deteksjon, FACS eller via PCR-basert deteksjon av det tilsvarende mRNA.

10 Betegnelsen "CD20-uttrykkende kreft" som anvendt her refererer fortrinnsvis til lymfomer (fortrinnsvis B-celle Non-Hodgkins lymfom (NHL)) og lymfocytiske leukemier. Slike lymfomer og lymfocytiske leukemier omfatter f.eks. a) follikulære lymfomer, b) Små Non-Cleaved celle lymfomer/ Burkitts lymfom (omfattende endemisk Burkitts lymfom, sporadisk Burkitts lymfom og non-Burkitts lymfom) c)
 15 marginalsonelymfomer (omfattende ekstranodalt marginalsone B-celle lymfom (mukosaassosiert lymfatisk vev lymfomer, MALT), nodalt marginalsone B-celle lymfom og splenisk marginalsone lymfom), d) mantelcelle lymfom (MCL), e) storcellet lymfom (omfattende diffust storcellet B-celle lymfom (DLCL), diffust blandet celle lymfom, immunoblastisk lymfom, primært mediastinalt B-celle lymfom, angiosentrisk lymfom-
 20 pulmonal B-celle lymfom) f) hårcelleleukemi, g) lymfocytisk lymfom, Waldenstrøms makroglobulinemi, h) akutt lymfocytisk leukemi (ALL), kronisk lymfocytisk leukemi (CLL)/ små lymfocytisk lymfom (SLL), B-celle prolymfocytisk leukemi, i) plasmacelle neoplasmer, plasmacelle myelom, multippelt myelom, plasmacytom j) Hodgkins sykdom.

25 Fortrinnsvis er den CD20-uttrykkende kreften et B-celle Non-Hodgkins lymfom (NHL). Spesielt er den CD20-uttrykkende kreften et mantelcelle lymfom (MCL), akutt lymfocytisk leukemi (ALL), kronisk lymfocytisk leukemi (CLL), diffust storcellet B-celle lymfom (DLCL), Burkitts lymfom, hårcelleleukemi, follikulært lymfom, multippelt
 30 myelom, marginalsonelymfom, post-transplantasjon lymfoproliferativ lidelse (PTLD), HIV-assosiert lymfom, Waldenstrøms makroglobulinemi eller primært CNS lymfom.

Som anvendt her angår "autoimmun sykdom" en sykdom eller lidelse som oppstår fra og er rettet mot et individs eget vev. Eksempler på autoimmune sykdommer eller
 35 lidelser omfatter, men er ikke begrenset til artritt (revmatoid artritt, juvenil revmatoid artritt, osteoartritt, psoriatisk artritt), psoriasis, dermatitt, polymyositt/ dermatomyositt, toksisk epidermal nekrolyse, systemisk sklerodermi og sklerose,

responser forbundet med 1 5 inflammatorisk tarmsykdom, Crohns sykdom, ulcerøs
 kolitt, respiratorisk stress-syndrom, sjokklunge (ARDS), meningitt, encefalitt, uveitt,
 kolitt, glomerulonefritt, allergiske lidelser, eksem, astma, lidelser som involverer
 infiltrering av T-celler og kronisk inflammatoriske responser, aterosklerose,
 5 autoimmun myokarditt, leukocytt adhesjonsdefekt, systemisk lupus erythematosus
 (SLE), ungdomsdiabetes, multippel sklerose, allergisk encefalomyelitt,
 immunresponser forbundet med akutt og forsinket hypersensitivitet mediert av
 cytokiner og T-lymfocytter, tuberkulose, sarkoidose, granulomatose omfattende
 Wegeners granulomatose, agranulocytose, vaskulitt (omfattende ANCA), aplastisk
 10 anemi, Blackfan-Diamond-anemi, immun hemolytisk anemi omfattende autoimmun
 hemolytisk anemi (AIHA), pernisiøs anemi, erytroaplasi (PRCA), faktor VIII-mangel,
 hemofili A, autoimmun nøytropeni, pancytopeni, leukopeni, sykdommer som
 involverer leukocytt-diapedese, inflammatoriske lidelser i sentralnervesystem (CNS),
 multippel organskadesyndrom, myasthenia gravis, antigen-antistoff kompleks-
 15 medierte sykdommer, anti-glomerulær basalmembransykdom, anti-fosfolipidantistoff
 syndrom, allergisk nevritt, Bechets sykdom, Castlemans sykdom, Goodpastures
 syndrom, Lambert-Eaton myastenisk syndrom, Reynauds syndrom, Sjøgrens syndrom,
 Stevens Johnson syndrom, bulløs pemfigoid, pemfigus, autoimmune
 polyendokrinopati, s nefropati, IgM polyneuropati eller IgM-mediert neuropati,
 20 idiopatisk trombocytopen purpura (ITP), trombotisk trombocytopenisk purpura (TTP),
 autoimmun trombocytopeni, autoimmun sykdom i testikler og eggstokker omfattende
 autoimmun orchitt og ooforitt, primær hypotyreoidisme; autoimmun endokrine
 sykdommer omfattende autoimmun tyreoiditt, kronisk tyreoiditt (Hashimotos
 tyreoiditt), subakutt tyreoiditt, idiopatisk hypotyreoidisme, Addisons sykdom, Graves
 25 sykdom, autoimmune polyglandulære syndromer (eller polyglandulær I endokrinopati
 syndromer), diabetes type I også referert til som insulinavhengig diabetes i mellitus
 (IDDM) og Sheehans syndrom; autoimmun hepatitt, lymfoid interstitial pneumonitt
 (HIV), bronchiolitis obliterans (ikke-transplantat) vs NSIP, Guillain-Barré syndrom,
 vaskulitt i store kar (omfattende polymyalgia rheumatica og kjempecelle (Takayasu)
 30 arteritt), vaskulitt i middels kar (omfattende Kawasakis sykdom og polyarteritis
 nodosa), ankyloserende spondylitt, Bergers sykdom (IgA nefropati), hurtig
 progredierende glomerulonefritt, primær biliær cirrhose, cøliaki (glutenenteropati),
 kryoglobulinemi, amyotrofisk lateralsklerose (ALS), koronararteriesykdom osv.

35 Terapeutiske formuleringer av antistoffene anvendt i henhold til foreliggende
 oppfinnelse blir fremstilt for lagring ved å blande et antistoff som har ønsket grad av
 renhet med eventuelle farmasøytisk akseptable bærere, tilsetningsmidler eller

stabiliseringsmidler (Remington's Pharmaceutical sciences 16th utgave, Osol, A. Ed. (1980)), i form av lyofiliserte formuleringer eller vandige løsninger. Akseptable bærere, tilsetningsmidler eller stabiliseringsmidler er ikke toksiske for mottagere ved de anvendte dosene og konsentrasjonene.

5

Betegnelsen "surfaktant" som anvendt her betyr et farmasøytisk akseptabelt overflateaktivt middel. I formuleringen ifølge oppfinnelsen er mengden av overflateaktivt middel beskrevet som en prosentdel uttrykt i vekt/volum. Den vanligst anvendte vekt/volum-enheten er mg/ml. Egnede farmasøytisk akseptable surfaktanter

10 omfatter men er ikke begrenset til ikke-ioniske overflateaktive midler så som TWEEN™, PLURONICS™ eller polyetylenglykol (PEG). Videre omfattet, men ikke begrenset til, er polyetylen-sorbitan-fettsyreestere, polyetylen-polypropylenglykol, polyoksyetylen-stearater og natrium-dodecylsulfater. Foretrukne polyetylen-sorbitan er polyetylen(20)-sorbitan-estere (synonym til polysorbat 20, solgt under varemerket

15 Tween 20™) og polyoksyetylen(20)sorbitanmonooleat (synonym til polysorbat 80 solgt under varemerket Tween 80™). Foretrukne polyetylen-polypropylenglykoler er de solgt under navnene Pluronic® F68 eller Poloksamer 188™. Mest foretrukket er Poloksamer 188™. Foretrukne polyoksyetylen-stearater er de solgt under varemerket Myrj™. Foretrukket polyoksyetylen monolauryleter er den solgt under varemerket

20 Brij™. Når polyetylen-sorbitan-polyetylen(20)-sorbitan-estere (Tween 20™) og polyoksyetylen(20)sorbitanmonooleat (Tween 80™) blir anvendt blir de generelt anvendt i en mengde på ca. 0,001 til ca. 1 %, fortrinnsvis på ca. 0,005 til ca. 0,1 % og enda mer foretrukket ca. 0,01 % til ca. 0,04 %vekt/volum.

25 Betegnelsen "buffer" som anvendt her betyr en farmasøytisk akseptabel buffer. Egned farmasøytisk akseptabel buffer omfatter men er ikke begrenset til histidin-buffere, citratbuffere, succinat-buffere, acetatbuffere og fosfatbuffere. Foretrukne buffere omfatter L-histidin eller blandinger av L-histidin med L-histidinhydroklorid med isotonisitetmidler og potensielt pH-justering med en syre eller en base kjent på

30 området. Mest foretrukket er L-histidin. De ovennevnte histidinbuffere blir generelt anvendt i en mengde på ca. 1 mM til ca. 100 mM, fortrinnsvis på ca. 5 mM til ca. 50 mM og enda mer foretrukket på ca. 20 mM. Uavhengig av bufferen anvendt, vil pH bli justert ved en verdi omfattende ca. 4,5 til ca. 7,0 og fortrinnsvis ca. 5,5 til ca. 6,5 og enda mer foretrukket ca. 6,0 ved justering med en syre eller base kjent på området

35 eller ved anvendelse av passende blandinger av bufferkomponenter eller begge.

Betegnelsen "isotonisitetetsmidler" som anvendt her betyr farmasøytisk akseptable isotonisitetetsmidler. Isotonisitetetsmidler blir anvendt for å tilveiebringe en isotonisk formulering. En isotonisk formulering er væske eller væske rekonstituert fra en fast form, f.eks. en lyofilisert form og angir en løsning som har samme tonisitet som en
5 eller annen andre løsning med hvilken den blir sammenlignet, så som fysiologisk saltløsning og blodserum. Egnede isotonisitetetsmidler omfatter men er ikke begrenset til salter, omfattende men ikke begrenset til natriumklorid(NaCl) eller kaliumklorid, sukker omfattende men ikke begrenset til glukose, sukrose, trehalose eller glyserin og hvilken som helst komponent fra gruppen aminosyrer, sukkere, salter og
10 kombinasjoner derav. Isotonisitetetsmidler blir generelt anvendt i en total mengde på ca. 5 mM til ca. 350 mM.

Betegnelsen "væske" som anvendt her i forbindelse med formuleringen ifølge oppfinnelsen betyr en formulering som er flytende ved en temperatur på minst ca. 2 til
15 ca. 8 °C.

Betegnelsen "lyofilisert" som anvendt her i forbindelse med formuleringen ifølge oppfinnelsen betyr en formulering som blir tørket ved å fryse formuleringen og deretter sublimere isen fra det frosne innholdet ved hvilke som helst
20 frysetørkingsmetoder kjent på området, for eksempel kommersielt tilgjengelige anordninger for frysetørking.

Betegnelsen "salter" som anvendt her betyr et salt i en mengde på ca. 1 mM til ca. 500 mM. Ikke-begrensede eksempler på salter omfatter salter av hvilke som helst
25 kombinasjoner av kationene natrium kalium, kalsium eller magnesium med anionene klorid, fosfat, sitrat, succinat, sulfat eller blandinger derav.

Betegnelsen "aminosyre" som anvendt her betyr en aminosyre i en mengde på ca. 1 til ca. 100 mg/ml omfattende men ikke begrenset til arginin, glysin, ornitin, glutamin, asparagin, lysin, histidin, glutaminsyre, asparagic syre, isoleucin, leucin, alanin, feny alanin, tyrosin, tryptofan, metionin, serin, prolin.
30

Betegnelsen "sukker" som anvendt her betyr et farmasøytisk akseptabelt sukker anvendt i en mengde på ca. 25 mM til ca. 500 mM. Foretrukket er 100 til 300 mM. Mer foretrukket er 220 til 260 mM. Mest foretrukket er 240 mM. Egnede sukkere omfatter men er ikke begrenset til monosakkarider og disakkarider. Ikke-begrensede eksempler på sukkere ifølge oppfinnelsen omfatter trehalose, sukrose, mannitol,
35

sorbitol, laktose, glukose, mannose, maltose, galaktose, fruktose, sorbose, raffinose, glukosamin, N-metylglukosamin (såkalt "meglumin"), galaktosamin og neuraminsyre og kombinasjoner derav. Mest foretrukket er trehalose.

5 Betegnelsen "stabilisator" angir farmasøytisk akseptable stabiliseringsmidler, som for eksempel men ikke begrenset til aminosyrer og sukkere som beskrevet i avsnittet ovenfor så vel som kommersielt tilgjengelige dekstraner av hvilken som helst type og molekylvekt som kjent på området.

10 Betegnelsen "antioksidant" betyr en farmasøytisk akseptabel antioksidant. Dette kan omfatte tilsetningsmidler så som metionin, benzylalkohol eller hvilket som helst annet tilsetningsmiddel anvendt for å begrense oksidasjon.

15 Betegnelsen "fremgangsmåte for behandling av" eller ekvivalent derav, når anvendt for, for eksempel kreft, refererer til en fremgangsmåte eller virkningsforløp som er designet for å redusere eller eliminere antall kreftceller hos en pasient eller for å lindre symptomene på kreft. "En fremgangsmåte for behandling av" kreft eller en annen proliferativ lidelse betyr ikke nødvendigvis at kreftcellene eller annen lidelse faktisk vil bli eliminert, at antall celler eller lidelsen faktisk vil reduseres eller at symptomene på
20 kreft eller annen lidelse faktisk vil bli lindret. Ofte vil en fremgangsmåte for behandling av kreft utføres selv med lav sannsynlighet for suksess, men som, gitt den medisinske historie og beregnet forventet overlevelse for en pasient, allikevel anses for å foranledige et generelt fordelaktig virkningsforløp.

25 Formuleringen ifølge oppfinnelsen kan være i en flytende form, i en lyofilisert form eller i en væskeform rekonstituert fra en lyofilisert form.

I én utførelsesform er formuleringen ifølge oppfinnelsen en lyofilisert formulering. Den lyofiliserte formuleringen ifølge oppfinnelsen har fordelen av en forbedret stabilitet
30 med hensyn til dannelsen av partikulært materiale og aggregater med høyere molekylvekt som vanligvis er vanskelig å oppnå med flytende formuleringer ved samme konsentrasjon av det beskrevne anti-CD20-antistoffet.

35 Formuleringen ifølge oppfinnelsen kan administreres ved intravenøs (i.v.), subkutan (s.c.) eller hvilke som helst andre parentale administreringsveier så som de kjent på det farmasøytiske området.

- Videre kan en formulering ifølge oppfinnelsen omfatte konserveringsmidler (så som oktadecyldimetylbenzyl ammoniumklorid; heksametoniumklorid; benzalkoniumklorid, benzetoniumklorid; fenol, butyl eller benzylalkohol; alkylparabener så som metyl eller propylparaben; katekol; resorcinol; sykloheksanol; 3-pentanol; og m-kresol);
- 5 polypeptider med lav molekylvekt (mindre enn ca. 10 rester); proteiner, så som serumalbumin, gelatin eller immunglobuliner; kelaterende midler så som EDTA; saltdannende motioner så som natrium; metallkomplekser (f.eks. Zn-proteinkomplekser).
- 10 De aktive ingrediensene kan også være sperret inne i mikrokapsler fremstilt, for eksempel ved koaservasjonsteknikker eller ved interfasepolymerisering, for eksempel hydroksymetylcellulose eller gelatin-mikrokapsler og poly (metylmetakrylat)-mikrokapsler, henholdsvis, i kolloidale medikamentleveringssystemer (for eksempel liposomer, albumin mikrokuler, mikroemulsjoner, nanopartikler og nanokapsler) eller i
- 15 makroemulsjoner. Slike teknikker er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences 16th utgave, Osol, A. Ed. (1980).

Preparater med forlenget frigjøring kan fremstilles. Egnede eksempler på preparater med forlenget frigjøring omfatter semipermeable matrikser av faste hydrofobe

20 polymerer inneholdende antistoffet, hvilke matrikser er i form av formede artikler, f.eks. filmer eller mikrokapsler. Eksempler på matrikser med forlenget frigjøring omfatter polyestere, hydrogeler (for eksempel poly(2-hydroksyetyl-metakrylat) eller poly(vinylalkohol)), polylaktider (US 3,773,919), kopolymerer av L-glutaminsyre og gamma-etyl-L-glutamat, ikke-nedbrytbart etylen-vinylacetat, nedbrytbare melkesyre-

25 glykolsyre kopolymerer så som LUPRON DEPOT™ (injiserbare mikrokuler sammensatt av melkesyre-glykolsyre-kopolymer og leuprolidacetat) og poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre.

Formuleringene som skal anvendes for *in vivo* administrering må være sterile. Dette

30 oppnås lett ved filtrering gjennom sterilfiltreringsmembraner.

Fortrinnsvis omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen én eller flere isotoniseringsmidler i en mengde på ca. 5 mM til ca. 350 mM som definert ovenfor.

35 Fortrinnsvis omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen et sukker i en mengde på ca. 25 mM til ca. 500 mM som definert ovenfor.

Fortrinnsvis omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen videre også én eller flere av de følgende bestanddelene: antioksidanter, askorbinsyre, Glutation, konserveringsmidler, f.eks. m-kresol, fenol, benzylalkohol, metylparaben, propylparaben, klorbutanol, tiomersal, benzalkoniumklorid, polyetylenglykol, f.eks. PEG 3000, 3350, 4000, 6000, albumin, humant serumalbumin (HSA), bovint serumalbumin (BSA), flerverdig alkohol, glyserol, etanol, mannitol, salter, acetatsalter (f.eks. natriumacetat), magnesiumklorid, kalsiumklorid, trometamin, EDTA, (f.eks. Na-EDTA).

Fortrinnsvis omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen videre også én eller flere stabiliseringsmidler som definert ovenfor og bestanddeler også kjent på området som "lyoprotektanter" så som sukkere, sukkeralkoholer, aminosyrer og dekstraner som kjent på området.

Beskrevet er de følgende formuleringene, enten i flytende form, lyofilisert form eller væske rekonstituert fra lyofilisert form:

10 mg/ml av
HuMab<CD20>,
0,01 % polysorbat 20 vekt/volum,
20 mM L-histidin og
140 mM natriumklorid,
ved pH 6,0;

eller
15 mg/ml av
HuMab<CD20>,
Eventuelt 0,001 til 1 % vekt/volum av en surfaktant,
20 mM L-histidin,
ved pH 6,0;

eller
10 mg/ml av
HuMab<CD20>,
0,02 % polysorbat 20 vekt/volum,
20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0;

- eller
25 mg/ml av
HuMab<CD20>,
5 0,02 % polysorbat 20 vekt/volum,
20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0;
- 10 eller
25 mg/ml av
HuMab<CD20>,
0,02 % Poloksamer188™ vekt/volum,
20 mM L-histidin og
15 240 mM trehalose,
ved pH 6,0;
- eller
25 mg/ml av
20 HuMab<CD20>,
0,01 % Poloksamer188™ vekt/volum,
20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0;
- 25 eller
25 mg/ml av
HuMab<CD20>,
0,1 % Poloksamer188™ vekt/volum,
30 20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0;
- eller
35 25 mg/ml av
HuMab<CD20>,
0,02 % Polysorbat 80 vekt/volum,

20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0;

5 eller
25 mg/ml av
HuMab<CD20>,
0,1% Polysorbat 80 vekt/volum,
20 mM Acetat og
10 240 mM trehalose,
ved pH 5,5;

eller
25 mg/ml av
15 HuMab<CD20>,
0,1 % Polysorbat 80 vekt/volum,
20 mM Acetat og
140 mM Natriumklorid,
ved pH 5,5;

20 eller
30 mg/ml av
HuMab<CD20>,
0,01 % Poloksamer188™ vekt/volum,
25 20 mM L-histidin og
200 mM trehalose,
ved pH 6,5.

Formuleringene ifølge oppfinnelsen er beskrevet i kravene.

30 I en foretrukket utførelsesform av formuleringen ifølge oppfinnelsen, er formuleringen
i en lyofilisert form og omfatter etter rekonstituering med en passende mengde vann
for injeksjon:

35 10 mg/ml av
HuMab<CD20>,
0,02 % polysorbat 20 vekt/volum,

20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0.

- 5 Denne formuleringen oppviser en god stabilitet ved lagring ved 2-8°C og 25° med tilstrekkelig stabilitet med hensyn til fysiske endepunkter så som aggregering og kjemiske endepunkter så som fragmentering.

10 I en foretrukket utførelsesform av formuleringen ifølge oppfinnelsen, er formuleringen i en flytende form:

25 mg/ml av
HuMab<CD20>,
0,02 % Poloksamer188™ vekt/volum,
15 20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0.

20 I en foretrukket utførelsesform er formuleringen anvendelig for forebygging eller reduksjon av metastase eller ytterligere spredning hos en slik pasient som lider av CD20-uttrykkende kreft. Formuleringen er anvendelig for å øke overlevelsesvarigheten hos en slik pasient, øke progresjonsfri overlevelse av en slik pasient, øke responsvarigheten, hvilket resulterer i en statistisk signifikant og klinisk relevant forbedring av den behandlede pasienten som målt ved varigheten av overlevelse,
25 progresjonsfri overlevelse, responsrate eller varighet av respons. I en foretrukket utførelsesform er formuleringen anvendelig for å øke responsraten i en gruppe pasienter.

30 I sammenheng med foreliggende oppfinnelse kan ytterligere andre cytotoksiske, kjemoterapeutiske eller anti-kreftmidler eller forbindelser som fremmer virkningene av slike midler anvendes i kombinasjon med anti-CD20 antistoff-formuleringen ifølge oppfinnelsen.

35 Slike midler omfatter for eksempel: alkyleringsmidler eller midler med en alkylende virkning, så som syklofosamid (CTX; f.eks. cytoxan®), klorambucil (CHL; f.eks. leukeran®), cisplatin (CisP; f.eks. platinol®) busulfan (f.eks. myleran®), melfalan, karmustin (BCNU), streptozotocin, trietylenmelamin (TEM), mitomycin C og lignende;

anti-metabolitter, så som metotrexat (MTX), etoposid (VP16; f.eks. vepesid®), 6-merkaptopurin (6MP), 6-tioguanin (6TG), cytarabin (Ara-C), 5-fluoruracil (5-FU), capecitabin (f.eks. Xeloda®), dakarbazin (DTIC) og lignende; antibiotika, så som actinomycin D, doksorubicin (DXR; f.eks. adriamycin®), daunorubicin (daunomycin), bleomycin, mitramycin og lignende; alkaloider, så som vinkaalkaloider så som vinkristin (VCR), vinblastin og lignende; og andre antitumormidler, så som paklitaksel (f.eks. taxol®) og paklitaksel-derivater, cytostatiske midler, glukokortikoider så som deksametason (DEX; f.eks. decadron®) og kortikosteroider så som prednison, nukleosid enzyminhibitorer så som hydroksyurea, aminosyre depleterende enzymer så som asparaginase, leucovorin og andre folinsyrederivater og lignende, ulike antitumormidler. De følgende midlene kan også anvendes som ytterligere midler: arnifostin (f.eks. ethyol®), daktinomycin, mekloretoamin (nitrogensennep), streptozocin, syklofosamid, lomustin (CCNU), doksorubicin lipo (f.eks. doxil®), gemcitabin (f.eks. gemzar®), daunorubicin lipo (f.eks. daunoxome®), prokarbazin, mitomycin, docetaksel (f.eks. taxotere®), aldesleukin, karboplatin, oksaliplatin, kladribin, kamptotecin, CPT 11 (irinotekan), 10-hydroksy 7-etyl-kamptotecin (SN38), floxuridin, fludarabin, ifosfamid, idarubicin, mesna, interferon beta, interferon alfa, mitoksantron, topotecan, leuprolid, megestrol, melfalan, merkaptopurin, plicamycin, mitotan, pegaspargase, pentostatin, pipobroman, plicamycin, tamoksifen, teniposid, testolakton, tioguanin, tiotepa, uracil sennep, vinorelbin, klorambucil. Fortrinnsvis blir anti-CD20 antistoff kombinasjonsbehandlingen anvendt uten slike ytterligere midler.

Anvendelse av de cytotoksiske midlene og antikreftmidlene beskrevet ovenfor så vel som antiproliferativt målspesifikt antikreft-medikament som proteinkinase inhibitorer i kjemoterapeutiske regimer er generelt godt karakterisert innenfor området som angår kreftbehandling og anvendelse av dem heri faller inn under samme betraktninger for overvåkning av toleranse og effektivitet og for å kontrollere administreringsveier og doser, med noen justeringer. For eksempel kan de nøyaktige dosene av de cytotoksiske midlene variere avhengig av responsen til pasientens dyrkede celler bestemt ved anvendelse av histo kulturmetoder. Generelt vil dosen bli redusert sammenlignet med mengden anvendt i fravær av ytterligere andre midler.

Typiske doser av et effektivt cytotoksisk middel kan være i områdene anbefalt av produsenten og kan, hvor angitt ved *in vitro* responser eller responser i dyremodeller, reduseres med opptil omtrent én størrelsesorden av konsentrasjon eller mengde. Følgelig vil den aktuelle dosen avhenge av legens bedømmelse, tilstanden til pasienten og effektiviteten av den terapeutiske metoden basert på *in vitro* mottakelighet av de

primære dyrkede maligne celler eller histo-dyrket vevsprøve eller responsene observert i de egnede dyremodellene.

I sammenheng med foreliggende oppfinnelse kan en effektiv mengde av
5 ioniserende stråling foretas og/eller et radiofarmasøytisk middel kan anvendes i tillegg til anti-CD20 antistoff-formuleringen ifølge oppfinnelsen. Kilden for stråling kan være enten utvendig eller innvendig for pasienten som behandles. Når kilden er ekstern for pasienten, er behandlingen kjent som "external beam radiation therapy" (EBRT). Når kilden for stråling er inne i pasienten, blir behandlingen betegnet brachyterapi (BT).
10 Radioaktive atomer for anvendelse i sammenheng med foreliggende oppfinnelse kan velges fra gruppen omfattende, men ikke begrenset til, radium, cesium-137, iridium-192, americium-241, gull-198, kobolt-57, kobber-67, technetium-99, jod-123, jod-131 og indium-111. Det er også mulig å merke antistoffet med slike radioaktive isotoper. Fortrinnsvis blir anti-CD20 antistoff-formuleringen ifølge oppfinnelsen
15 anvendt uten slik ioniserende stråling.

Strålebehandling er en standard behandling for kontroll av tumorer og/eller tumormetastaser som ikke kan fjernes eller opereres. Forbedrede resultater har blitt sett når strålebehandling er kombinert med kjemoterapi. Strålebehandling er basert
20 på prinsippet om at høydose stråling levert til et målområde vil resultere i død av reproduktive celler i både tumor og normalt vev. Doseregimet for stråling er generelt definert med hensyn til absorbert strålingsdose (Gy), tid og fraksjonering og må defineres nøyaktig av onkologen. Mengden av stråling en pasient mottar vil avhenge av forskjellige hensyn, men de to viktigste er lokaliseringen av tumoren i forhold til
25 andre kritiske strukturer eller organer i kroppen og i hvilket omfang tumoren har spredt seg. Et typisk behandlingsforløp for en pasient som gjennomgår strålebehandling vil være en behandlingsplan over en periode på 1 til 6 uker, med en total dose på mellom 10 og 80 Gy administrert til pasienten i en enkel daglig fraksjon på ca. 1,8 til 2,0 Gy, 5 dager per uke. I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen er
30 det synergisk når tumorer hos humane pasienter behandles med formuleringen ifølge oppfinnelsen og stråling. Med andre ord blir hemning av tumorvekst ved hjelp av midlene omfattende kombinasjonen ifølge oppfinnelsen forbedret når kombinert med stråling, eventuelt med ytterligere kjemoterapeutiske midler eller antikreftmidler. Parametere for adjuvant strålebehandling er for eksempel inneholdt i WO 99/60023.

35

Antistoff-formuleringen blir administrert til en pasient i henhold til kjente metoder, ved intravenøs administrering som en bolus eller ved kontinuerlig infusjon over et tidsrom,

ved intramuskulær, intraperitoneal, intracerebrospinal, subkutan, intraartikulær, intrasynovial eller intratekal administreringsvei. Intravenøs eller subkutan administrering av antistoffene er foretrukket.

5 Oppfinnelsen omfatter videre et sett karakterisert ved at det omfatter en beholder, et preparat inne i beholderen omfattende nevnte formulering av anti-CD20 antistoffet og et pakningsvedlegg som instruerer brukeren av formuleringen om å administrere nevnte formulering av anti-CD20 antistoffet til en pasient som lider av CD20-uttrykkende kreft.

10

Betegnelsen "pakningsvedlegg" refererer til instruksjoner vanligvis inkludert i kommersielle pakninger av terapeutiske produkter, hvilke kan omfatte informasjon om indikasjoner, anvendelse, dose, administrering, kontraindikasjoner og/eller advarsler angående anvendelse av slike terapeutiske produkter.

15

I en foretrukket utførelsesform kan, produkt for fremstilling beholdere videre omfatte en farmasøytisk akseptabel bærer. Produktet for fremstilling kan videre omfatte et sterilt fortynningsmiddel, som fortrinnsvis er lagret i en separat ytterligere beholder.

20

Som anvendt heri skal en "farmasøytisk akseptable bærer" omfatte hvilke som helst og alle materialer kompatible med farmasøytisk administrering omfattende løsningsmidler, dispersjonsmedia, belegg, antibakterielle og antifungale midler, isotoniske og absorpsjonsforsinkende midler og andre materialer og forbindelser kompatible med farmasøytisk administrering. Bortsett fra for så vidt som noen konvensjonelle media eller midler er inkompatible med den aktive forbindelsen, er anvendelse derav i preparatene ifølge oppfinnelsen omfattet. Supplerende aktive forbindelser kan også innføres i preparatene.

25

I enda en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen et type I anti-CD20 antistoff som blir koadministrert med et type II anti-CD20 antistoff ifølge oppfinnelsen. Formuleringene ifølge oppfinnelsen kan være to separate formuleringer for hvert av anti-CD20 antistoffene. Alternativt kan formuleringen her også inneholde begge antistoffene i én formulering.

30

I enda en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen et anti-CD20 antistoff i at nevnte anti-CD20 antistoff blir koadministrert med et anti-Bcl-2 aktivt middel. Betegnelsen "Bcl-2" som anvendt her angir Bcl-2

35

proteinet (Swiss Prot ID nr. P10415), et medlem av Bcl-2 familien av proteiner. Betegnelsen "anti-Bcl-2 aktivt middel" omfatter "anti-Bcl-2 antisense nukleotider" og Bcl-2 inhibitorer". "Anti-Bcl-2 antisense nukleotider" nedregulerer Bcl-2 mRNA-nivåer og reduserer ekspresjon av Bcl-2 protein. Eksempler på slike anti-Bcl-2 antisense nukleotider omfatter Oblimersen og SPC-2996. ABT-737 som anvendt her betyr N-[4-[4-(4'-klorbifenyl-2-ylmetyl)piperazin-1-yl]benzoyl]-3-[3-(dimetylamino)-1(R)-(fenylsulfanylmetyl)propylamino]-4-nitrobenzensulfonamid; 4-[4-(4'-klorbifenyl-2-ylmetyl)piperazin-1-yl]-N-[3-[3-(dimetylamino)-1(R)-(fenylsulfanylmetyl)propylamino]-4-nitrofenylsulfonyl]benzamid, en Bcl-2 inhibitor, som er beskrevet i WO 2006/099667 eller Corey, S., et al., Cancer Cell (2005) 5-6. BT-263 som anvendt her betyr en Bcl-2 inhibitor, som er beskrevet i US 2007027135. Fortrinnsvis er det anti-Bcl-2 aktive midlet valgt fra Oblimersen, SPC-2996, TA-402, Gossypol, AT-101, Obatoclox mesylat, A-371191, A-385358, A-438744, ABT-737, AT-101, BL-11, BL-193, GX-15-003, 2-metoksyantimycin A₃, HA-14-1, KF-67544, Purpurogallin, TP-TW-37, YC-137 og Z-24. Henvist til er det anti-Bcl-2 aktive midlet en Bcl-2 proteinbindende inhibitor med en IC₅₀ for den anti-Bcl-2-inhibitoriske aktiviteten på 5 µM eller mindre. Slik Bcl-2 proteinbindende inhibitor er fortrinnsvis valgt fra Gossypol, AT-101, Obatoclox mesylat, ABT-263 og ABT-737, mer foretrukket fra ABT-263 eller ABT-737.

I enda en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen et anti-CD20 antistoff ved at nevnte anti-CD20 antistoff blir koadministrert med en proteasominhibitor. Betegnelsen "proteasominhibitor" som anvendt her angir midler som hemmer aktiviteten av 26S proteasomet. Slike proteasominhibitorer omfatter bl.a. f.eks. peptidderivater så som peptid aldehyder (f.eks. MG132, MG115, CEP-1615, PSI eller immunoproteasom-spesifikk inhibitor IPSI-001 (Cbz-LnL-CHO = N-karbobenzyl-oksy-leucyl-norleucinal, se US 20060241056), peptidboronater (f.eks. bortezomib (PS-341) eller DFLB), peptid-epoksyketoner (f.eks. epoksomicin, dihydroeponemycin eller epoksomicinderivat carfilzomib (PR-171)) eller peptidvinylsulfoner (f.eks. NLVS) og ikke-peptidderivater så som salinosporamid A (NPI-0052), salinosporamid A-derivater, lactacystin eller lactacystin-derivater (f.eks. clasto-lactacystin-L-lakton (omuralid) eller PS-519). De forskjellige typene og strukturene av nevnte proteasominhibitorer er beskrevet f.eks. i Kisselev, A.L., et al., Chem Biol (2001) 739-758, WO 2004/004749 og Joazeiro, C., et al., Res 66(16) (2006) 7840-7842), Kanagasabay, et al., Curr Opin Investig Drugs 8 (2007) 447-51, Adams, J., Nat Rev Cancer 4 (2004) 349-360 og US 20060241056.

Fortrinnsvis er slik proteasominhibitor valgt fra peptid aldehyder (fortrinnsvis N-karbobenzyloksy-leucyl-norleucinal (IPSI-001)), peptidboronater (fortrinnsvis bortezomib (PS-341)), peptidepoksyketoner (fortrinnsvis epoksomicinerivat carfilzomib (PR-171)) eller salinosporamid A (NPI-0052). Mer foretrukket er slik

5 proteasominhibitor valgt fra bortezomib (PS-341), carfilzomib (PR-171), salinosporamid A (NPI-0052) eller N-karbobenzyloksy-leucyl-norleucinal (IPSI-001).

I en foretrukket utførelsesform er proteasominhibitoren et peptidderivat valgt fra peptidaldehyder (fortrinnsvis N-karbobenzyloksy-leucyl-norleucinal (IPSI-001)),

10 peptidboronater (fortrinnsvis bortezomib (PS-34)) eller peptidepoksyketoner. I en annen foretrukket utførelsesform er proteasominhibitoren et peptidboronat (fortrinnsvis bortezomib (PS-341); se, f.eks. Adams, Cur. Opin. Chem Biol. 6 (2002) 493-500 og US 5,780,454)).

15 Fortrinnsvis har proteasominhibitoren en IC₅₀ for den anti-proteasom-hemmende aktiviteten på 5 µM eller mindre, mer foretrukket på 1 µM eller mindre. En Celle-Basert analyse for å identifisere slike proteasominhibitorer og for bestemmelse av IC₅₀ for den anti-proteasom-hemmende aktiviteten (via seriefortynninger og beregning ved anvendelse av en ikke-lineær kurvetilpasning (XLfit programvare (ID

20 Business Solution Ltd., Guilford, Surrey, UK)) er beskrevet i Moravec, et al., Cell Notes 15 (2006) 4-7 ved anvendelse av Proteasome-Glo™ Cell-Based Assay Reagents fra Promega med U266-celler (humant plasma myelom). Denne "tilsette-blande-måle" analysen måler den chymotrypsinlignende proteaseaktiviteten forbundet med proteasomet i dyrkede celler.

25 I tillegg til IPSI-001 (Cbz-LnL-CHO = N-karbobenzyloksy-leucyl-norleucinal) er de følgende peptidderivatene ifølge US 20060241056 også foretrukne proteasominhibitorer: N-karbobenzyloksy-homofenylalanyl-fenylalanylal, N-karbobenzyloksy-leucyl-fenylalanylal, N-karbobenzyloksy-alanyl-fenylalanylal, N-karbobenzyloksy-glycyl-prolyl-alanyl-fenylalanylal, N-karbobenzyloksy-glycyl-prolyl-fenylalanyl-fenylalanylal, N-karbobenzyloksy-glycyl-fenylalanyl-fenylalanylal, N-karbobenzyloksy-leucyl-norleucin-borsyre, N-karbobenzyloksy-fenylalanyl-fenylalanin-borsyre, N-karbobenzyloksy-homofenylalanyl-fenylalanin-borsyre, N-karbobenzyloksy-leucyl-fenylalanin-borsyre, N-karbobenzyloksy-glycyl-prolyl-alanyl-fenylalanin-borsyre, N-

30 karbobenzyloksy-glycyl-prolyl-fenylalanyl-fenylalanin-borsyre, N-karbobenzyloksy-leucyl-leucyl-fenylalanin-borsyre, N-karbobenzyloksy-glycyl-fenylalanyl-fenylalanin-borsyre, N-karbobenzyloksy-leucyl-norleucin metylvinylsulfon, N-karbobenzyloksy-

35

fenylalanyl-fenylalanin-metyl-vinylsulfon, N-karbobenzyloksy-homofenylalanyl-fenylalanin-metyl-vinylsulfon, N-karbobenzyloksy-leucyl-fenylalanin-metyl-vinylsulfon, N-karbobenzyloksy-alanyl-fenylalanin-metyl-vinylsulfon, N-karbobenzyloksy-glycyl-prolyl-alanyl-fenylalanin-metyl-vinylsulfon, N-karbobenzyloksy-glycyl-prolyl-fenylalanyl-fenylalanin-metyl-vinylsulfon, N-karbobenzyloksy-leucyl-leucyl-fenylalanin-metyl-vinylsulfon, N-karbobenzyloksy-glycyl-fenylalanyl-fenylalanin-metyl-vinylsulfon, N-karbobenzyloksy-leucyl-norleucin-epoksy-ke-ton, N-karbobenzyloksy-fenylalanyl-fenylalanin-epoksy-ke-ton, N-karbobenzyloksy-homofenylalanyl-fenylalanin-epoksy-ke-ton, N-karbobenzyloksy-leucyl-fenylalanin-epoksy-ke-ton, N-karbobenzyloksy-alanyl-fenylalanin-epoksy-ke-ton, N-karbobenzyloksy-glycyl-prolyl-alanyl-fenylalanin-epoksy-ke-ton, N-karbobenzyloksy-glycyl-prolyl-fenylalanyl-fenylalanin-epoksy-ke-ton, N-karbobenzyloksy-leucyl-leucyl-fenylalanin-epoksy-ke-ton og N-karbobenzyloksy-glycyl-fenylalanyl-fenylalanin-epoksy-ke-ton.

De følgende eksemplene og figurene er gitt for å bidra til forståelse av foreliggende oppfinnelse, for hvilken det nøyaktige omfang er angitt i de tilhørende kravene. Det vil forstås at modifikasjoner kan foretas i fremgangsmåtene angitt uten å avvike fra oppfinnelsens idé.

20 **EKSEMPLER**

Eksempel 1

De følgende formuleringene, enten i flytende form, lyofilisert eller væske rekonstituert fra lyofilisert form ble fremstilt:

15 mg/ml HuMab<CD20>,
0,01 % polysorbat 20 vekt/volum,
20 mM L-histidin og
30 140 mM natriumklorid,
ved pH 6,0;

10 mg/ml HuMab<CD20>,
0,01 % polysorbat 20 vekt/volum,
35 20 mM L-histidin og
140 mM natriumklorid,
ved pH 6,0;

15 mg/ml HuMab<CD20>,
20 mM L-histidin,
ved pH 6,0;

5

10 mg/ml HuMab<CD20>,
0,02 % polysorbat 20 vekt/volum,
20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0;

10

25 mg/ml HuMab<CD20>,
0,02 % polysorbat 20 vekt/volum,
20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0.

15

Det ble også fremstilt en lyofilisert form som etter rekonstituering med passende mengde vann for injeksjon omfatter:

20

10 mg/ml HuMab<CD20>,
0,02 % polysorbat 20 vekt/volum,
20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0.

25

Denne formuleringen oppviser god stabilitet ved lagring ved 2-8°C og 25° med tilstrekkelig stabilitet med hensyn til fysiske endepunkter så som aggregering og kjemiske endepunkter så som fragmentering.

30

Flytende og lyofiliserte medikament produkt-formuleringer for parenteral administrering ifølge oppfinnelsen ble utviklet som følger:

Fremstilling av flytende formuleringer.

35

Formuleringer av HuMab<CD20> ble fremstilt ved homogenisering av løsninger av HuMab<CD20> i produksjonsbufferen (f.eks. 20 mM histidinbuffer ved pH ca. 6,0 eller

20 mM histidinbuffer ved pH ca. 6,0 inneholdende 140 mM natriumklorid og 0,01 % (vekt/volum) polysorbat 20). Formuleringer av HuMab<CD20> kan også fremstilles ved regulering av proteinkonsentrasjonen til den ønskede konsentrasjonen ved fortykning med buffer. Tilsetningsmidler for å stabilisere proteinet og for

5 tonisitetsjustering ble tilsatt som nødvendig og kan tilsettes i oppløst form eller alternativt som fast stoff. Overflateaktivt middel ble tilsatt til formuleringene som en stockløsning som nødvendig. Alle formuleringer ble sterilfiltrert gjennom 0,22 µm filtere og aseptisk alikvotert i sterile glassampuller og lukket med gummikorker og "alucrimp" lokk. Disse formuleringene ble lagret ved forskjellige temperaturer i

10 forskjellige tidsintervaller og fjernet for analyse på tidspunktene angitt i de individuelle avsnittene. Formuleringer ble analysert 1) ved UV spektrofotometri, 2) ved størrelseseksklusjonskromatografi (SEC), 3) for synlige og ikke synlige partikler, 4) ved ionebytterkromatografi (IEC) og 5) ved turbiditet av løsningen.

15 **Fremstilling av lyofiliserte formuleringer.**

Løsninger av HuMab<CD20> ble enten fremstilt som beskrevet ovenfor for flytende formuleringer eller fremstilt ved homogenisering av HuMab<CD20>-løsninger av HuMab<CD20> i 20 mM histidinbuffer ved pH ca. 6,0, inneholdende et sukker og et

20 overflateaktivt middel. Alle formuleringene ble sterilfiltrert gjennom 0,22 µm filtere og aseptisk alikvotert inn i sterile glassampuller. Ampullene ble delvis lukket med gummikorker egnet for anvendelse i lyofiliseringsprosesser og overført til tørkekammeret til lyofilisatoren. Hvilken som helst metode for lyofilisering kjent på området skal være innenfor omfanget av oppfinnelsen. For eksempel omfattet

25 lyofiliseringsmetoden anvendt for denne studien avkjøling av formuleringen fra romtemperatur til omtrent 5 °C (forhånds avkjøling) fulgt av en frysing ved -40°C (Freeze I) ved en stigningsrate på ca. 1 °C/min til 5 °C/min. Det første tørkestrinnet kan finne sted ved en stigningsrate på 0,3 til 0,5 °C / min fra -40 °C til -30 °C og deretter holde ved -30 °C i minst 50 timer ved et kammertrykk på ca. 75 til 80 mTorr.

30 Et andre tørkingstrinn kan finne sted ved en stigningsrate på 0,1 til 0,3 °C / min fra -30 °C til 25 °C og holde ved 25 °C i minst 5 timer ved et kammertrykk på ca. 50 til 80 mTorr (den anvendte tørkingsplanen er gitt i Tabell 1). HuMab<CD20>-formuleringer som ble tørket ved anvendelse av de beskrevne lyofiliseringsprosessene ble funnet å ha hensiktsmessig hurtige rekonstitueringstider på ca. 2-3 minutter. Alle lyofiliserte

35 kaker i denne studien hadde et resterende vanninnhold på omtrent 0,1 til 1,0 % som bestemt ved Karl-Fischer metode. Den lyofiliserte ampullen ble lagret ved forskjellige temperaturer i forskjellige tidsintervaller. De lyofiliserte formuleringene ble

rekonstituert med det respektive volumet av vann for injeksjon (WFI) før 1) analyse ved UV spektrofotometri, 2) bestemmelse av rekonstitueringstiden, 3) analyse ved størrelseseksklusjons-kromatografi (SEC) 4) ved ionebytterkromatografi (IEC), 5) bestemmelse av ikke synlige og synlige partikler og 6) ved turbiditet av løsningen.

5

Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) ble utført for å detektere oppløselige høymolekylære spesier (aggregater) og lavmolekylære hydrolyseprodukter i formuleringene. Metoden anvendte et egnet HPLC-instrument utstyrt med en UV-detektor (deteksjonsbølgelengde 280 nm) og en Zorbax GF-250 kolonne (9,4 x 250

10

mm, Agilent); metoden anvendte 200 mM natriumfosfat pH 7,0 som mobil fase.

Ionebytterkromatografi (IEC) ble utført for å detektere kjemiske degraderingsprodukter som endrer netto ladning av HuMab<CD20> i formuleringene. Metoden anvendte et egnet HPLC-instrument utstyrt med en UV-detektor (deteksjonsbølgelengde 220 og 280nm) og en Dionex ProPac WCX-10 kolonne (4mm x 250mm). 10 mM natriumfosfatbuffer pH 6,0 i H₂O og 10 mM natriumfosfatbuffer pH 6,0 + 0,75M NaCl ble anvendt som mobile faser A og B, henholdsvis, med en strømningshastighet på 1,0 ml/min.

15

20

UV-spektroskopi for bestemmelse av proteinkonsentrasjonen ble utført på et Varian Cary Bio UV spektrofotometer ved 280 nm.

For bestemmelse av turbiditeten ble opalescens målt i FTU (turbiditetsenheter) ved anvendelse av et HACH 2100AN turbidimeter ved romtemperatur.

25

Prøver ble analysert for ikke synlige partikler ved anvendelse av en HIAC Royco PharmaSpec (HRLD-150) og for synlige partikler ved anvendelse av et Seidenader V90-T visuell inspeksjons-instrument.

30

Tabell 1 Frysetørkingssyklus

Trinn	Hylletemperatur (°C)	Stigningsrate (°C/min)	Holdetid (min)	Vakuum innstillingspunkt (mTorr)
Forhånds-avkjøling	5°C	0,0	60	-
Freeze I	-40°C	1,0	120	-

Trinn	Hylletemperatur (°C)	Stigningsrate (°C/min)	Holdetid (min)	Vakuuminstillingspunkt (mTorr)
Primær tørking	-30°C	0,5	3720	80
Sek tørking	+25°C	0,2	300	80

Stabilitetsdata for flytende HuMab<CD20> medikamentprodukt-formuleringer ifølge foreliggende oppfinnelse

5

Formulering 15 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM L-histidin, pH 6,0,

Lagringsbetingelser	Lagrings-tid (måneder)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbiditet	IEC Signifikante endringer	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
Initielt		14,5	98,4	1,6	5,9	Nei	Passerer	Passerer
2-8°C	1	14,7	98,1	1,8	5,9	Nei	Passerer	Passerer
	3	15,5	97,9	2,0	6,1	Nei	Passerer	Passerer
	6	14,2	97,7	2,1	5,7	Nei	Passerer	Passerer
25°C	1	14,8	98,0	1,7	5,7	Nei	Passerer	Passerer
	3	15,0	97,8	1,8	5,8	Nei	Passerer	Passerer
	6	14,6	97,3	1,9	6,1	Ja	Mislykket	Passerer
40°C	1	14,8	97,6	1,6	5,8	Nei	Passerer	Passerer
	3	15,1	96,1	1,9	6,2	Ja	Passerer	Passerer
-20°C	1	14,8	98,4	1,6	6,3	n/d	Mislykket	Passerer
	3	15,1	98,1	1,8	6,2	Nei	Mislykket	Passerer
	6	14,3	97,7	2,3	6,1	Nei	Mislykket	Passerer
-80°C	3	15,0	98,2	1,6	5,8	Nei	Mislykket	Passerer
	6	14,9	98,4	1,6	5,7	Nei	Mislykket	Passerer

n/d: ikke bestemt

Passerer: fri til hovedsakelig fri for synlige partikler, maks 6000 partikler $\geq 10\mu\text{m}$ /beholder, maks 600 partikler $\geq 25\mu\text{m}$ /beholder

Formulering 10 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM L-histidin, 240 mM trehalose, 0,02 % vekt/volum Polysorbat 20, pH 6,0,

Lagrings- beting- elser	Lagrings- tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbidi- tet	IEC Signifi- kante endringer	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
Initielt		11,0	98,4	1,6	3,9	Nei	Passerer	Passerer
2-8°C	1	11,1	98,3	1,6	4,0	Nei	Mislykket	Passerer
	3	11,3	98,2	1,7	6,6	Nei	Mislykket	Passerer
	6	10,8	98,1	1,7	8,3	Nei	Mislykket	Passerer
25°C	1	11,0	98,3	1,4	6,4	Nei	Mislykket	Passerer
	3	11,3	98,2	1,5	6,7	Nei	Mislykket	Passerer
	6	11,2	98,8	1,4	6,7	Ja	Mislykket	Passerer
40°C	1	11,1	98,0	1,3	7,5	Nei	Mislykket	Passerer
	3	11,2	96,7	1,5	4,9	Ja	Mislykket	Passerer
-20°C	1	11,0	98,5	1,5	3,4	Nei	Passerer	Passerer
	3	11,2	98,3	1,6	4,0	Nei	Passerer	Passerer
	6	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
-80°C	3	11,2	98,3	1,6	3,7	Nei	Passerer	Passerer
	6	11,0	98,5	1,5	3,8	Nei	Passerer	Passerer

n/d = ikke bestemt

Passerer: fri til hovedsakelig fri for synlige partikler, maks 6000 partikler $\geq 10 \mu\text{m}$ /beholder, maks 600 partikler $\geq 25 \mu\text{m}$ /beholder

Stabilitetsdata for lyofiliserte huMab<CD20> medikament produkt-formuleringer ifølge foreliggende oppfinnelse

5

Formulering 10 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM L-histidin, 240 mM trehalose, 0,02 % vekt/volum Polysorbat 20, pH 6,0,

Lagrings- beting- elser	Lagrings- tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbidi- tet	IEC Hoved topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
Initielt		10,4	98,9	1,1	2,9	54,8	Passerer	Passerer

Lagrings- beting- elser	Lagrings- tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbidi- tet	IEC Hoved topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
2-8°C	1	10,5	98,9	1,1	2,9	n/d	Passerer	Passerer
	3	10,4	98,9	1,1	2,9	n/d	Passerer	Passerer
	6	10,4	98,9	1,1	3,4	53,1	Passerer	Passerer
	12	10,4	98,9	1,1	3,1	56,6	Passerer	Passerer
	24	10,3	98,9	1,1	3,1	55,6	Passerer	Passerer
25°C	1	10,2	98,9	1,1	2,9	n/d	Passerer	Passerer
	3	105	98,9	1,1	2,9	n/d	Passerer	Passerer
	6	10,4	98,9	1,1	3,3	52,9	Passerer	Passerer
	12	10,4	98,8	1,2	3,1	56,9	Passerer	Passerer
40°C	1	10,5	98,9	1,1	3,0	n/d	Passerer	Passerer
	3	10,4	98,9	1,1	3,0	n/d	Passerer	Passerer
	6	10,5	98,9	1,1	3,4	50,9	Passerer	Passerer
n/d = ikke bestemt Passerer: fri til hovedsakelig fri for synlige partikler, maks 6000 partikler $\geq 10 \mu\text{m}$ /beholder, maks 600 partikler $\geq 25 \mu\text{m}$ /beholder								

Eksempel 2

- 5 De følgende formuleringene, enten i flytende form, lyofilisert form eller væske rekonstituert fra lyofilisert form ble fremstilt:

25 mg/ml HuMab<CD20>,
0,02 % Poloksamer188[™] vekt/volum,

- 10 20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0;

eller

- 15 25 mg/ml HuMab<CD20>,

0,01 % Poloksamer188[™] vekt/volum,
20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0;

5

eller

25 mg/ml HuMab<CD20>,
0,1 % Poloksamer188[™] vekt/volum,
20 mM L-histidin og
10 240 mM trehalose,
ved pH 6,0;

eller

25 mg/ml HuMab<CD20>,
15 0,02 % Polysorbat 80 vekt/volum,
20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0;

20

eller

25 mg/ml HuMab<CD20>,
0,1 % Polysorbat 80 vekt/volum,
20 mM Acetat og
240 mM trehalose,
25 ved pH 5,5;

eller

25 mg/ml HuMab<CD20>,
0,1 % Polysorbat 80 vekt/volum,
30 20 mM Acetat og
140 mM Natriumklorid,
ved pH 5,5;

eller

35 30 mg/ml HuMab<CD20>,
0,01 % Poloksamer188[™] vekt/volum,
20 mM L-histidin og

200 mM trehalose,
ved pH 6,5.

5 Flytende og lyofiliserte medikament produkt-formuleringer for parenteral administrering ble fremstilt som følger:

Fremstilling av flytende formuleringer.

10 Formuleringer av HuMab<CD20> ble fremstilt ved homogenisering av løsninger av HuMab<CD20> i produksjonsbufferen (f.eks. 20 mM histidinbuffer ved pH ca. 6,0 inneholdende 240 mM trehalose og 0,02 % (vekt/volum) Poloksamer188™).

Formuleringer av HuMab<CD20> kan også fremstilles ved diafiltrering av løsninger av ca. 10-40 mg/ml HuMab<CD20> i produksjonsbufferen (f.eks. 20 mM histidinbuffer ved pH ca. 6,0) ved tangential flow filtrering (TFF) for å øke proteinkonsentrasjonen

15 over målprotein-konsentrasjonen og for utveksling av buffer. Formuleringer av HuMab<CD20> kan også fremstilles ved justering av proteinkonsentrasjonen til den ønskede konsentrasjonen ved fortynning med buffer. Tilsetningsmidler for å stabilisere proteinet og for tonisitetsjustering kan tilsettes i oppløst form eller alternativt som fast stoff. Overflateaktivt middel ble tilsatt til formuleringene som en stockløsning som

20 nødvendig. Alle formuleringer ble sterilfiltrert gjennom 0,22 µm filtere og aseptisk alikvotert inn i sterile glassampuller og lukket med gummikorker og alucrimp lokk. Disse formuleringene ble lagret ved forskjellige temperaturer i forskjellige tidsintervaller og fjernet for analyse på tidspunktene angitt i de individuelle avsnittene. Formuleringer ble analysert 1) ved UV spektrofotometri, 2) ved

25 størrelseseksklusjonskromatografi (SEC), 3) for synlige og ikke synlige partikler, 4) ved ionebytterkromatografi (IEC) og 5) ved turbiditet av løsningen.

Fremstilling av lyofiliserte formuleringer.

30 Løsninger av <CD20> ble fremstilt som beskrevet ovenfor for flytende formuleringer. Alle formuleringer ble sterilfiltrert gjennom 0,22 µm filtere og aseptisk alikvotert inn i sterile glassampuller. Ampullene ble delvis lukket med gummikorker egnet for anvendelse i lyofiliseringsprosesser og overført til tørkekammeret av lyofilisatoren. Hvilken som helst lyofiliseringsmetode kjent på området skal være innenfor omfanget

35 av oppfinnelsen. For eksempel omfattet lyofiliseringsmetoden anvendt for denne studien avkjøling av formuleringen fra romtemperatur til omtrent 5 °C (forhånds avkjøling) fulgt av en frysing ved -40°C (Freeze I) ved en stigningsrate på ca. 1

°C/min til 5 °C/min. Det første tørkettrinnet kan finne sted ved en stigningsrate på 0,3 til 0,5 °C / min fra -40 °C til -30 °C og deretter holde ved -30°C i minst 50 timer ved et kammertrykk på ca. 75 til 80 mTorr. Et andre tørkingstrinn kan foregå ved en stigningsrate på 0,1 til 0,3 °C / min fra -30 °C til 25 °C og holde ved 25 °C i minst 5 timer ved et kammertrykk på ca. 50 til 80 mTorr (den anvendte tørkingsplanen er gitt i Tabell 1). HuMab<CD20> formuleringer som ble tørket ved anvendelse av de beskrevne lyofiliseringsmetodene ble funnet å ha et resterende vanninnhold på omtrent 0,1 til 1,0 % som bestemt ved Karl-Fischer metode. Den lyofiliserte ampullen ble lagret ved forskjellige temperaturer i forskjellige tidsintervaller. De lyofiliserte formuleringene ble rekonstituert med de respektive volumene av vann for injeksjon (WFI) før 1) analyse ved UV spektrofotometri, 2) analyse ved størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) 3) ved ionebytterkromatografi (IEC), 4) bestemmelse av ikke synlige og synlige partikler og 5) ved turbiditet av løsningen.

Størrelseseksklusjonskromatografi (SEC) ble utført for å detektere oppløselige høymolekylære spesier (aggregater) og lavmolekylære hydrolyseprodukter i formuleringene. Metoden anvendte et egnet HPLC-instrument utstyrt med en UV-detektor (deteksjons bølgelengde 280 nm) og enten en Zorbax GF-250 kolonne (9,4 x 250 mm, Agilent) eller en TSKgel G3000 SWXL (7,8x300mm); metoden anvendte enten 200 mM natriumfosfat pH 7,0 eller 250 mM kaliumklorid i 200 mM kaliumfosfat pH 7,0 som mobil fase.

Ionebytterkromatografi (IEC) ble utført for å detektere kjemiske degraderingsprodukter som endrer netto ladning av HuMab<CD20> i formuleringene. Metoden anvendte et egnet HPLC-instrument utstyrt med en UV-detektor (deteksjonsbølgelengde 220 og 280 nm) og en Dionex ProPac WCX-10 kolonne (4 mm x 250mm). 10 mM natriumfosfatbuffer pH 6,0 i H₂O og 10 mM natriumfosfatbuffer pH 6,0 + 0,75M NaCl ble anvendt som mobile faser A og B, henholdsvis, med en strømningshastighet på 1,0 ml/min.

UV-spektroskopi for bestemmelse av proteinkonsentrasjonen ble utført i et Varian Cary Bio eller et Perkin Elmer UV spektrofotometer ved 280 nm.

For bestemmelse av turbiditeten ble opalescens målt i FTU (turbiditet enheter) ved anvendelse av et HACH 2100AN turbidimeter ved romtemperatur.

Prøver ble analysert for ikke synlige partikler ved anvendelse av en HIAC Royco PharmaSpec (HRLD-150) og for synlige partikler ved anvendelse av et Seidenader V90-T visuell inspeksjonsinstrument.

5 Tabell 1 Frysetørkingssyklus

Trinn	Hylle-temperatur (°C)	Stignings-rate °C/min)	Holde-tid (min)	Vakuum innst. - punkt (mTorr)
Forhånds-avkjøling	5°C	0,0	60	-
Freeze I	-40°C	1,0	120	-
Primær tørking	-30°C	0,5	3720	80
Sek tørking	+25°C	0,2	300	80

Stabilitetsdata for flytende HuMab<CD20> medikamentprodukt-formuleringer

Formulering 25 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM L-histidin, 240 mM trehalose, 0,02 % vekt/volum Poloksamer188™, pH 6,0,

10

Lagrings- betingelser	Lagrings- tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbi- ditet	IEC Hoved topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
Initielt		25,7	98,7	1,3	6,4	61,6	Passerer	Passerer
2-8°C	1	25,6	98,7	1,3	6,0	62,0	Passerer	Passerer
	3	26,1	98,6	1,3	5,9	61,0	Passerer	Passerer
25°C	1	25,7	98,5	1,4	6,5	62,0	Passerer	Passerer
	3	26,0	97,9	1,5	5,9	58,5	Passerer	Passerer
40°C	1	25,7	97,9	1,6	6,6	52,6	Passerer	Passerer
	3	25,7	91,0	2,4	6,7	33,6	Passerer	Passerer
-80°C	3	25,6	98,7	1,3	6,2	60,9	Passerer	Passerer
-20°C	3	25,5	98,7	1,3	6,3	60,8	Passerer	Passerer

Passerer: fri til hovedsakelig fri for synlige partikler, maks 6000 partikler $\geq 10 \mu\text{m}$ /beholder, maks 600 partikler $\geq 25 \mu\text{m}$ /beholder

Formulering 25 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM L-histidin, 240 mM trehalose, 0,01 % vekt/volum Poloksamer188™, pH 6,0,

Lagrings-betingelser	Lagrings-tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbi-ditet	IEC Hoved-topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
Initielt		26,4	99,6	0,4	5,5	72,2	Passerer	Passerer
2-8°C	1	26,4	99,7	0,3	5,7	n/a	Passerer	Passerer
	2	26,3	99,5	0,5	5,7	72,0	Passerer	Passerer
	3	26,3	99,5	0,5	6,3	72,6	Passerer	Passerer
	9	26,2	99,4	0,6	6,0	70,8	Passerer	Passerer
	12	26,4	99,5	0,5	6,5	70,1	Passerer	Passerer
25°C	1	n/a	99,6	0,4	5,2	n/a	Passerer	Passerer
	2	n/a	99,4	0,6	5,7	70,6	Passerer	Passerer
	3	n/a	99,4	0,6	6,1	66,5	Passerer	Passerer
	9	26,4	95,7	0,8	5,9	58,2	Passerer	Passerer
	12	26,5	95,5	0,7	6,1	54,9	Passerer	Passerer
40°C	1	n/a	98,2	0,3	5,4	58,6	Passerer	Passerer
	2	n/a	97,4	0,8	5,7	50,4	Passerer	Passerer
	3	n/a	96,7	1,0	6,3	n/a	Passerer	Passerer
-80°C	9	25,7	99,5	0,5	5,9	72,3	Passerer	Passerer
n/a: ikke analysert Passerer: fri til hovedsakelig fri for synlige partikler, maks 6000 partikler ≥ 10 µm /beholder, maks 600 partikler ≥ 25 µm /beholder								

- 5 Formulering 25 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM L-histidin, 240 mM trehalose, 0,1 % vekt/volum Poloksamer188™, pH 6,0,

Lagrings-betingelser	Lagrings-tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbi-ditet	IEC Hoved-topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
Initielt		26,4	99,6	0,4	5,5	71,5	Passerer	Passerer

Lagrings-betingelser	Lagrings-tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbi-ditet	IEC Hoved-topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
2-8°C	1	26,7	99,7	0,3	6,2	n/a	Passerer	Passerer
	2	26,5	99,5	0,5	5,4	73,0	Passerer	Passerer
	3	26,4	99,5	0,5	6,3	70,9	Passerer	Passerer
	9	26,5	99,4	0,6	6,4	71,8	Passerer	Passerer
	12	26,6	99,5	0,5	5,8	70,0	Passerer	Passerer
25°C	1	n/a	99,6	0,4	5,2	n/a	Passerer	Passerer
	2	n/a	99,4	0,6	5,7	70,7	Passerer	Passerer
	3	n/a	99,4	0,6	6,2	67,4	Passerer	Passerer
	9	26,6	95,7	0,8	6,2	58,6	Passerer	Passerer
	12	26,6	95,4	0,7	6,0	54,9	Passerer	Passerer
40°C	1	n/a	98,0	0,5	5,3	59,3	Passerer	Passerer
	2	n/a	97,4	0,8	5,8	51,8	Passerer	Passerer
	3	n/a	96,6	1,1	7,0	n/a	Passerer	Passerer
-80°C	9	26,1	99,5	0,5	5,9	71,0	Passerer	Passerer
n/a: ikke analysert Passerer: fri til hovedsakelig fri for synlige partikler, maks 6000 partikler $\geq 10 \mu\text{m}$ /beholder, maks 600 partikler $\geq 25 \mu\text{m}$ /beholder								

Formulering 25 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM acetat, 240 mM trehalose, 0,1 % vekt/volum Polysorbat 80, pH 5,5,

Lagrings-betingelser	Lagrings-tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbi-ditet	IEC Hoved-topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
Initielt		24,6	99,6	0,4	8,2	71,9	Passerer	Passerer
2-8°C	1	24,8	99,7	0,3	4,9	n/a	Passerer	Passerer
	2	24,5	99,4	0,6	5,2	72,6	Passerer	Passerer
	3	24,3	99,4	0,6	7,0	66,2	Passerer	Passerer

Lagrings- betingelser	Lagrings- tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbi- ditet	IEC Hoved- topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
25°C	1	n/a	99,6	0,4	6,7	n/a	Passerer	Passerer
	2	n/a	99,3	0,7	7,0	71,9	Passerer	Passerer
	3	n/a	99,2	0,8	7,3	65,1	Passerer	Passerer
40°C	1	n/a	97,5	1,0	26,8	52,9	Passerer	Passerer
	2	n/a	96,0	2,1	27,8	42,1	Passerer	Passerer
	3	n/a	94,4	3,2	26,8	n/a	Passerer	Passerer

n/a: ikke analysert

Passerer: fri til hovedsakelig fri for synlige partikler, maks 6000 partikler $\geq 10 \mu\text{m}$ /beholder, maks 600 partikler $\geq 25 \mu\text{m}$ /beholder

Formulering 25 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM Acetat, 140 mM natriumklorid, 0,1 % vekt/volum Polysorbat 80, pH 5,5,

Lagrings- betingelser	Lagrings- tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbi- ditet	IEC Hoved- topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
Initielt		23,7	99,5	0,5	11,4	70,9	Passerer	Passerer
2-8°C	1	24,4	99,6	0,4	11,4	n/a	Passerer	Passerer
	2	24,2	99,4	0,6	10,5	71,5	Passerer	Passerer
	3	24,2	99,3	0,7	12,5	71,3	Passerer	Passerer
25°C	1	n/a	99,5	0,5	12,0	n/a	Passerer	Passerer
	2	n/a	99,1	0,9	013,0	68,2	Passerer	Passerer
	3	n/a	99,1	0,9	13,2	64,6	Passerer	Passerer
40°C	1	n/a	96,9	1,2	26,8	54,0	Passerer	Passerer
	2	n/a	95,0	2,9	26,5	46,1	Passerer	Passerer
	3	n/a	93,1	4,2	26,1	n/a	Passerer	Passerer

n/a: ikke analysert

Passerer: fri til hovedsakelig fri for synlige partikler, maks 6000 partikler ≥10 µm /beholder,

Lagrings- betingelser	Lagrings- tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbi- ditet	IEC Hoved- topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
maks 600 partikler $\geq 25 \mu\text{m}$ /beholder								

5

Formulering 30 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM L-histidin, 200 mM trehalose, 0,01 % vekt/volum Poloksamer188TM, pH 6,5,

Lagrings- betingelser	Lagrings- tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbi- ditet	IEC Hoved- topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
Initielt		32,0	98,4	1,6	6,4	61,0	Passerer	Passerer
2-8°C	1	32,2	98,3	1,6	6,6	62,3	Passerer	Passerer
	3	32,9	98,1	1,7	5,7	60,5	Passerer	Passerer
25°C	1	32,2	98,1	1,8	6,2	60,9	Passerer	Passerer
	3	32,1	97,6	2,0	6,2	56,5	Passerer	Passerer
40°C	1	32,0	97,3	2,1	6,3	50,9	Passerer	Passerer
	3	32,3	89,9	3,0	7,2	31,1	Passerer	Passerer
-80°C	3	31,8	98,3	1,6	6,2	61,0	Passerer	Passerer
-20°C	3	32,1	98,3	1,6	6,6	60,7	Passerer	Passerer
Passerer: fri til hovedsakelig fri for synlige partikler, maks 6000 partikler $\geq 10 \mu\text{m}$ /beholder, maks 600 partikler $\geq 25 \mu\text{m}$ /beholder								

Stabilitetsdata for lyofiliserte huMab<CD20> medikamentprodukt-formuleringer

10

Formulering 25 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM L-histidin, 240 mM trehalose, 0,02 % vekt/volum Poloksamer188TM

Lagrings-betingelser	Lagrings-tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbi-ditet	IEC Hoved-topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
Initielt		25,5	98,9	1,0	6,2	61,2	Passerer	Passerer
2-8°C	1	25,2	99,0	1,0	5,8	63,1	Passerer	Passerer
	3	25,3	99,0	1,0	6,1	60,4	Passerer	Passerer
25°C	1	25,4	98,9	1,0	6,0	62,9	Passerer	Passerer
	3	25,6	98,5	1,1	6,1	60,2	Passerer	Passerer
40°C	1	25,3	98,9	1,1	6,3	60,6	Passerer	Passerer
	3	25,9	98,5	1,3	5,9	56,9	Passerer	Passerer
-80°C	3	25,3	98,9	1,0	6,3	61,2	Passerer	Passerer
-20°C	3	25,4	98,9	1,0	6,7	60,6	Passerer	Passerer
Passerer: fri til hovedsakelig fri for synlige partikler, maks 6000 partikler $\geq 10 \mu\text{m}$ /beholder, maks 600 partikler $\geq 25 \mu\text{m}$ /beholder								

5 Formulering 25 mg/ml HuMab<CD20>, 20 mM L-histidin, 240 mM trehalose, 0,02 % vekt/volum Polysorbat 80, pH 6,0,

Lagrings-betingelser	Lagrings-tid (mnd.)	Protein (mg/ml)	SEK Monomer (%)	SEK HMW (%)	Turbi-ditet	IEC Hoved-topp (%)	Synlige partikler	Ikke synlige partikler
Initielt		27,2	99,6	0,4	6,0	72,3	Passerer	Passerer
	1	27,1	99,7	0,3	6,1	n/a	Passerer	Passerer
2-8°C	2	27,0	99,5	0,5	5,8	74,0	Passerer	Passerer
	3	27,0	99,5	0,5	6,2	69,8	Passerer	Passerer
25°C	1	n/a	99,7	0,4	6,2	n/a	Passerer	Passerer
	2	n/a	99,5	0,5	5,4	66,2	Passerer	Passerer
	3	n/a	99,5	0,5	5,9	68,6	Passerer	Passerer
40°C	1	n/a	99,6	0,4	5,4	70,6	Passerer	Passerer
	2	n/a	99,4	0,6	5,4	70,1	Passerer	Passerer

Passerer: fri til hovedsakelig fri for synlige partikler, maks 6000 partikler $\geq 10 \mu\text{m}$ /beholder, maks 600 partikler $\geq 25 \mu\text{m}$ /beholder

Patentkrav

1. Formulering, som er i en lyofilisert form og omfatter
10 mg/ml av det humaniserte B-Ly 1-antistoffet omfattende VH B-HH6 og VL
5 B- KV1 ifølge WO 2005/044859,
0,02 % polysorbat 20 vekt/volum,
20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0.
- 10 2. Formulering, som omfatter
25 mg/ml av det humaniserte B-Ly 1-antistoffet omfattende VH B-HH6 og VL
B-KV1 ifølge WO 2005/044859,
0,02 % Poloksamer188TM vekt/volum,
15 20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
ved pH 6,0;
- 20 eller
25 mg/ml av det humaniserte B-Ly 1-antistoffet omfattende VH B-HH6 og VL
B-KV1 ifølge WO 2005/044859,
0,01 % Poloksamer188TM vekt/volum,
20 mM L-histidin og
25 240 mM trehalose,
ved pH 6,0;
- 30 eller
25 mg/ml av det humaniserte B-Ly 1-antistoffet omfattende VH B-HH6 og VL
B-KV1 ifølge WO 2005/044859,
0,1 % Poloksamer188TM vekt/volum,
20 mM L-histidin og
240 mM trehalose,
35 ved pH 6,0;
- eller

- 25 mg/ml av det humaniserte B-Ly 1-antistoffet omfattende VH B-HH6 og VL
 B- KV1 ifølge WO 2005/044859,
 0,02% Polysorbat 80 vekt/volum,
 20 mM L-histidin og
 5 240 mM trehalose,
 ved pH 6,0;
- eller
- 10 30 mg/ml av det humaniserte B-Ly 1-antistoffet omfattende VH B-HH6 OG VL
 B-KV1 ifølge WO 2005/044859,
 0,01 % Poloksamer188[™] vekt/volum,
 20 mM L-histidin og
 200 mM trehalose,
 15 ved pH 6,5.
- 3.** Formulering ifølge krav 2, som er i en flytende form og omfatter
 25 mg/ml av det humaniserte B-Ly 1-antistoffet omfattende VH B-HH6 og VL
 B-KV1 ifølge WO 2005/044859,
 20 0,02 % Poloksamer188[™] vekt/volum,
 20 mM L-histidin og
 240 mM trehalose,
 ved pH 6,0.
- 25 **4.** Anvendelse av en formulering ifølge ethvert av kravene 1 til 3 for
 fremstilling av et medikament anvendelig for behandling av CD20-relaterte
 sykdommer.
- 30 **5.** Anvendelse ifølge krav 4, hvor sykdommen er valgt fra gruppen bestående av
 B-celle Non-Hodgkins lymfom (NHL), mantelcellelymfom (MCL), akutt
 lymfocytisk leukemi (ALL), kronisk lymfocytisk leukemi (CLL), diffust storcellet
 B-celle lymfom (DLCL), Burkitts lymfom, hårcelleleukemi, follikulært lymfom,
 multippelt myelom, marginalsonelymfom, post-transplantasjon lymfoproliferativ
 lidelse (PTLD), HIV-assosiert lymfom, Waldenstrøms makroglobulinemi og
 35 primært CNS lymfom.