



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **323557**

(13) **B3**

NORGE

(51) **Int Cl.**

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

Patentstyret

Avviket fra Patent B1 etter administrativ begrensning

(21)	Søknadsnr	19980335	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.07.23 PCT/US1996/12251
(22)	Inng.dag	1998.01.26	(85)	Videreføringsdag	1998.01.26
(24)	Løpedag	1996.07.23	(30)	Prioritet	1995.07.27, US, 508014 1996.03.14, US, 615369
(41)	Alm.tilgj	1998.03.26			
(45)	Meddelt	2007.06.11			
(45)	Administrativ begrensning	2014.07.14			
(73)	Innehaver	Genentech Inc, 1 DNA Way, US-CA94080-4990 SOUTH SAN FRANCISCO, USA			
(72)	Oppfinner	Steven J. Shire, Belmont, CA, USA James Andya, Millbrae, CA, USA Jeffrey L. Cleland, San Carlos, CA, USA Chung C. Hsu, Los Altos Hills, CA, USA Xanthe M. Lam, San Francisco, CA, USA David E. Overcashier, El Granada, CA, USA Janet Yu-Feng Yang, San Mateo, CA, USA Sylvia Sau-Yan Wu, San Francisco, CA, USA			
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Stabil, rekonstituert formulering og lyofilisert formulering, fremgangsmåte for fremstilling av disse, fremstilt artikkel og anvendelse av formuleringene.			
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A1-661060			
(57)	Sammendrag				

Stabil lyofilisert proteinformulering beskrives som kan rekonstitueres med et egnet fortynningsmiddel for å danne en rekonstituert formulering med høy proteinkonsentrasjon som er egnet for subkutan administrering. Anti-IgE- og anti-HER2-antistoffformuleringer har f.eks. blitt fremstilt ved å frysetørke disse antistoffene i nærvær av en frysetørkingsbeskytter. Den lyofiliserte blanding som dermed dannes rekonstitueres til en høy proteinkonsentrasjon uten betydelige tap av proteinets stabilitet.

Oppfinnelsens bakgrunn

Oppfinnelsens område

5 Oppfinnelsen angår en stabil rekonstituert formulering. Det angår spesielt en stabil, lyofilisert proteinformulering som kan rekonstitueres med en fortynningsløsning og danne en stabil rekonstituert formulering egnet for subkutan administrering.

10 Beskrivelse av kjent teknikk

Fremgangen innen bioteknologien har i de siste ti årene gjort det mulig å frem-stille mange proteiner for farmasøytisk anvendelse ved bruk av rekombinante DNA teknikker. Fordi proteiner er større og mer komplekse enn tradisjonelle organiske og uorganiske legemidler (dvs. har flere funksjonelle grupper i tillegg til komplekse tredimensjonale strukturer), medfører formuleringen av slike proteiner spesielle problemer. En formulering må bevare konformasjonsstrukturen intakt på minst en kjernesekvens av proteinets aminosyrer, mens den samtidig beskytter proteinets mange funksjonelle grupper mot degradering. Degraderingsmåter for proteiner kan omfatte kjemisk ustabilitet (dvs. en hvilken som helst metode som omfatter endringer av proteinet ved dannelse eller splitting av binding medførende en ny kjemisk enhet) eller fysisk ustabilitet (dvs. endringer i proteinets struktur av høyere orden). Kjemisk ustabilitet kan skyldes deamidering, racemisering, hydrolyse, oksidering, beta-eliminering eller disulfidutskifting. Fysisk ustabilitet kan f.eks. skyldes denaturering, aggregering, utfelling eller adsorpsjon. De tre mest vanlige proteindegraderingsmåtene er proteinaggregering, deamidering og oksidering. Cleland *et al. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4):307-377 (1993).

Frysetørking er en vanlig anvendt teknikk for bevaring av proteiner som virker ved å fjerne vann fra proteinfremstillingene av interesse. Frysetørking, eller lyofilisering, er en metode der materialet som skal tørkes først fryses og så fjernes isen eller det frosne løsningsmiddel ved sublimering under vakuumbetingelser. En eksipiens kan inkluderes i prelyofiliserte formuleringer for å øke stabiliteten under frysetørkingsprosessen og/eller for å forbedre stabiliteten av det lyofiliserte produkt ved lagring. Pikal, M. *Biopharm.* 3(9)26-30 (1990) og Arakawa *et al. Pharm. Res.* 8(3):285-291 (1991).

35 Kjent teknikk er også funnet i EP-A1-661060.

WO 92/22653 beskriver utviklingen av en lyofilisert formulering inneholdende det humaniserte hellengdeantistoff huMAb4D5-8.

WO 89/11297 beskriver frysetørking av et ikke-spesifisert antistoff fra mus,

med maltose som frysetørkingsbeskytter.

Det er et formål med foreliggende oppfinnelse å frembringe en lyofilisert proteinformulering som er stabil ved lagring og avlevering. Det er videre et formål å frembringe et stabilt rekonstituert proteinpreparat som er egnet for subkutan administrering. I spesielle utførelsesformer er det et formål å frembringe et flerbrukspreparat som er stabilt i minst den tid det tar å administrere det til en pasient.

Sammendrag av oppfinnelsen

Oppfinnelsen angår en stabil, lyofilisert proteinformulering som kan fremstilles ved anvendelse av en frysetørkingsbeskytter (fortrinnsvis et sukker slik som sukrose eller trehalose), der den lyofiliserte formuleringen kan rekonstitueres for å danne en stabil rekonstituert formulering som har en proteinkonsentrasjon som er betydelig høyere (f.eks. fra ca. 2 - 40 ganger høyere, fortrinnsvis 3 - 10 ganger høyere og helst 3 - 6 ganger høyere) enn proteinkonsentrasjonen i den prelyofiliserte formulering. Mens proteinkonsentrasjonen i den prelyofiliserte formulering kan være 5 mg/ml eller mindre, så er protein-konsentrasjonen i den rekonstituerte formulering vanligvis 50 mg/ml eller mer. Slike høye proteinkonsentrasjoner i den rekonstituerte formulering blir antatt å være spesielt nyttig der formuleringen er beregnet på subkutan administrering. På tross av den veldig høye protein-konsentrasjon i den rekonstituerte formulering har det blitt funnet at den rekonstituerte formulering er stabil, (dvs. unnlater å vise betydelige eller uakseptable nivåer av kjemisk eller fysisk ustabilitet av proteinet) ved 2-8 °C i minst ca. 30 dager. I enkelte utførelsesformer er den rekonstituerte formulering isoton. Til tross for anvendelsen av lavere konsentrasjoner av frysetørkingsbeskytter for å oppnå slike isotone formuleringer etter rekonstituering, ble det herved funnet at proteinet i den lyofiliserte formulering for det meste beholder sin fysiske og kjemiske stabilitet og struktur ved frysetørking og lagring.

Ved rekonstituering med et fortynningsmiddel som omfatter et konserverings-middel (slik som bakteriostatisk vann for injeksjon, BWFI) kan den rekonstituerte formulering anvendes som en flerbruksformulering. En slik formulering er f.eks. nyttig der pasienten krever hyppige subkutane administreringer av proteinet for å behandle en kronisk medisinsk tilstand. Fordelen med en flerbruksformulering er at den fremmer enkel anvendelse for pasienten, reduserer svinn ved å bruke opp innholdet i en ampulle fullstendig, og fører til betydelig kostnadsbesparelse for produsentene siden flere doser pakkes i en enkelt ampulle (senker fyllings- og transportkostnader).

Oppfinnelsen vedrører en stabil rekonstituert formulering, kjennetegnet ved at den omfatter et antistoff i en mengde på 50 mg/ml til 400 mg/ml og et fortynningsmiddel, der den rekonstituerte formuleringen har blitt fremstilt fra en

lyofilisert blanding av et antistoff og en frysetørkingsbeskytter, der det molare forholdet frysetørkingsbeskytter:antistoff i blandingen er omtrent 100-600 mol frysetørkingsbeskytter:1 mol antistoff, og der antistoff-konsentrasjonen i den rekonstituerte formuleringen er omtrent 2-40 ganger høyere enn antistoffkonsentrasjonen i blandingen
5 før lyofilisering.

Forholdet mellom frysetørkingsbeskytter og protein i den lyofiliserte formulering i de foregående avsnitt avhenger f.eks. både av proteinet og den utvalgte frysetørkingsbeskytter, så vel som den ønskede proteinkonsentrasjon og isotonisitet av
10 den rekonstituerte formulering. I tilfellet av fullengdeantistoff (som proteinet) og trehalose eller sukrose (som frysetørkingsbeskytter) for å danne en isoton rekonstituert formulering med høy proteinkonsentrasjon, kan forholdet f.eks. være ca. 100-600 mol trehalose eller sukrose til 1 mol antistoff.

Vanligvis vil den prelyofiliserte formulering av proteinet og frysetørkings-
15 beskytteren videre omfatte en buffer som sørger for en egnet pH av formuleringen, avhengig av proteinet i formuleringen. I den hensikt er det blitt funnet at det er fordelaktig å anvende en histidinbuffer fordi, som demonstrert nedenfor, den ser ut til å inneha frysetørkingsbeskyttende egenskaper.

Formuleringen kan ytterligere omfatte en surfaktant (f.eks. et polysorbat)
20 idet det herved er blitt observert at den kan redusere aggregering av det rekonstituerte protein og/eller redusere dannelsen av partikler i den rekonstituerte formulering. Surfaktanten kan tilsettes den prelyofiliserte formulering, den lyofiliserte formulering og/eller den rekonstituerte formulering, (men helst den prelyofiliserte formulering) etter ønske.

25 Oppfinnelsen frembringer videre en fremgangsmåte for å fremstille en stabil, isoton, rekonstituert formulering, kjennetegnet ved at den omfatter å rekonstituere en lyofilisert blanding av et antistoff og en frysetørkingsbeskytter, der det molare forholdet mellom frysetørkingsbeskytter: antistoff i blandingen er omtrent 100-600 mol frysetørkingsbeskytter:1 mol antistoff i et fortynningsmiddel slik at
30 konsentrasjonen av antistoff i de rekonstituerte formuleringene er 50 mg/ml til 400 mg/ml, der konsentrasjonen av antistoff i den rekonstituerte formuleringen er 2-40 ganger høyere enn konsentrasjonen av antistoff i blandingen før lyofilisering.

I en annen utførelsesform frembringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en formulering inneholdende to trinn: (a) lyofilisering av en blanding av et
35 protein og en frysetørkingsbeskytter; og (b) rekonstituering av den lyofiliserte blandingen fra trinn (a) i et fortynningsmiddel slik at den rekonstituerte formulering blir isoton og stabil og har en proteinkonsentrasjon på minst ca. 50 mg/ml. Proteinkonsentrasjonen i den rekonstituerte formulering kan f.eks. være fra ca. 80 mg/ml til 300

mg/ml. Vanligvis er proteinkonsentrasjonen i den rekonstituerte formulering ca. 2 - 40 ganger høyere enn proteinkonsentrasjonen i blandingen før lyofilisering.

Oppfinnelsen angår også en fremstilt artikkel, kjennetegnet ved at den omfatter:

- 5 (a) en beholder som inneholder en lyofilisert blanding av et antistoff og en frysetørkingsbeskytter, der det molare forholdet frysetørkingsbeskytter : antistoff i blandingen er på omtrent 100-600 mol frysetørkingsbeskytter : 1 mol antistoff og (b) instruksjoner for å rekonstituere den lyofiliserte blandingen med et fortynningsmiddel for å få en anti-
- 10 stoffkonsentrasjon i den rekonstituerte formuleringen på 50 mg/ml til 400 mg/ml. Den fremstilte artikkel kan videre inneholde en annen beholder som inneholder et fortynningsmiddel (f.eks. bakteriostatisk vann for injeksjon (BWFI) omfattende en aromatisk alkohol).

- Oppfinnelsen angår også anvendelse av formulering ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et medikament til behandling av et pattedyr som har en forstyrrelse som
- 15 krever behandling med proteinet i formuleringen.

- En nyttig prelyofilisert anti-HER2-antistoffformulering som oppdaget i eksperimentene spesifisert nedenfor, ble funnet å omfatte anti-HER2 i en mengde fra ca. 5 - 40 mg/ml (f.eks. 20 - 30 mg/ml) og sukrose eller trehalose i en mengde fra ca. 10 - 100 mM (f.eks. 40 - 80 mM), en buffer (f.eks. histidin, pH 6 eller succinat, pH 5) og en
- 20 surfaktant (f.eks. et polysorbat). Den lyofiliserte formuleringen ble funnet å være stabil ved 40 °C i minst 3 måneder, og stabil ved 30 °C i minst 6 måneder. Denne anti-HER2-formulering kan rekonstitueres med et fortynningsmiddel for å danne en formulering velegnet for intravenøs administrering bestående av anti-HER2 i en mengde fra ca. 10 - 30 mg/ml som er stabil ved 2 - 8 °C i minst 30 dager. Der høyere konsentrasjoner av
- 25 anti-HER2-antistoff er ønsket (f.eks. der subkutan avlevering av antistoffet er den administrasjonsmåten man har til hensikt å benytte overfor pasienten), kan den lyofiliserte formulering rekonstitueres for å gi en stabil rekonstituert formulering som har en proteinkonsentrasjon på 50 mg/ml eller høyere.

- En fordelaktig prelyofilisert anti-IgE-antistoffformulering, herved oppdaget,
- 30 har anti-IgE i en mengde fra ca. 5 - 40 mg/ml (f.eks. 20 - 30 mg/ml) og sukrose eller trehalose i en mengde fra ca. 60 - 300 mM (f.eks. 80 - 170 mM), en buffer (fortrinnsvis histidin, pH 6) og en surfaktant (slik som et polysorbat). Den lyofiliserte anti-IgE-formulering er stabil ved 30 °C i minst ett år. Denne formulering kan rekonstitueres for å gi en formulering bestående av anti-IgE i en mengde fra ca. 15 - 45 mg/ml (f.eks. 15 -
- 35 25 mg/ml) egnet for intravenøs administrering som er stabil ved 2 - 8 °C i minst ett år. Der høyere konsentrasjoner av anti-IgE i formuleringen er ønsket, kan alternativt den lyofiliserte formulering rekonstitueres for å danne en stabil formulering som har en anti-IgE-konsentrasjon ≥ 50 mg/ml.

Oppfinnelsen vedrører en lyofilisert formulering, kjennetegnet ved at den omfatter en lyofilisert blanding av en frysetørkingsbeskytter og et monoklonalt antistoff, en buffer og en surfaktant, der antistoffet er huMab4D5-8, frysetørkingsbeskytteren er trehalose eller sukrose og det molare forholdet frysetørkings-beskytter:antistoff er omtrent 200-600 mol frysetørkings-beskytter:1 mol antistoff.

Oppfinnelsen vedrører i tillegg en rekonstituert formulering, kjennetegnet ved at den omfatter den ovenfor nevnte lyofiliserte formulering rekonstituert i et fortynningsmiddel, der konsentrasjonen av humanisert antistoff i den rekonstituerte formuleringen ligger innenfor området 50 mg/ml til 400 mg/ml.

Kort beskrivelse av figurene

Figur 1 viser effekten av rekonstitueringsvolumet på stabiliteten av lyofilisert rhuMAB HER2. Den lyofiliserte formulering ble laget fra en prelyofilisert formulering inneholdende 25 mg/ml protein, 60 mM trehalose, 50 mM natriumsuccinat, pH 5,0, og 0,01 % "Tween" 20. Den lyofiliserte kaken ble inkubert ved 40 °C og deretter rekonstituert med 4,0 (o) eller 20,0 ml (•) BWFI. Andelen intakt protein i den rekonstituerte formulering ble målt ved nativ størrelseseksklusjonskromatografi og definert som maksimumsareal av nativt protein i forhold til totalt maksimumsareal inkludert aggregater.

Figur 2 viser effekten av trehalosekonsentrasjon på stabiliteten av frysetørket rhuMAB HER2. Proteinene ble frysetørket ved 25 mg/ml i 5 mM natriumsuccinat, pH 5,0 (sirkler) og 5 mM histidin, pH 6,0 (kvadrater) og trehalosekonsentrasjon i området fra 60 mM (molforhold på 360) til 200 mM (molforhold på 1200). Det frysetørkede protein ble inkubert ved 40 °C i enten 30 dager (lukkede symboler) eller 91 dager (åpne symboler). Mengden intakt protein ble målt etter rekonstituering av frysetørket protein med 20 ml BWFI.

Figur 3 viser effekten av trehalosekonsentrasjonen på langtidsstabiliteten av frysetørket rhuMAB HER2 lagret ved 40 °C. Proteinene ble frysetørket ved enten 25 mg/ml i 5 mM natriumsuccinat, pH 5,0, 0,01 % "Tween", og 60 mM trehalose (■) eller 5 mM histidin, pH 6,0, 0,01 % "Tween", og 60 mM trehalose (□) eller 21 mg/ml i 10 mM natriumsuccinat, pH 5,0, 0,2 % Tween 20 og 250 mM trehalose (•). Det frysetørkede protein ble inkubert ved 40 °C og deretter rekonstituert med 20 ml BWFI. Mengden intakt protein ble målt etter rekonstituering.

Figur 4 viser stabiliteten av rhuMAB HER2 frysetørket i 38,4 mM mannitol (7 mg/ml), 20,4 mM sukrose (7 mg/ml), 5 mM histidin, pH 6,0, 0,01 % "Tween 20". Det frysetørkede protein ble inkubert ved 40 °C og deretter rekonstituert med enten 4,0 ml (åpen sirkel) eller 20 ml (lukket sirkel) BWFI. Mengden intakt protein ble målt etter

rekonstituering.

Figur 5 viser stabiliteten av rekonstituert rhuMAb HER2 frysetørket i 5 mM natriumsuccinat, pH 5,0, 60 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20". Prøver ble rekonstituert med enten 4,0 ml (kvadrater) eller 20,0 ml (sirkler) BWFI (20 ml:0,9 % benzylalkohol; 4 ml:1,1 % benzylalkohol) og deretter lagret ved 5 °C (lukkede symboler) eller 25 °C (åpne symboler). Prosenten nativt protein ble definert som maksimumsareal av nativt (ikke degradert) protein i forhold til det totale maksimumsareal målt ved kationbyttekromatografi.

Figur 6 viser stabiliteten av rekonstituert rhuMAb HER2 frysetørket i 5 mM histidin, pH 6,0, 60 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20". Prøver ble rekonstituert med enten 4,0 ml (kvadrater) eller 20,0 ml (sirkler) BWFI (20 ml: 0,9 % benzylalkohol; 4 ml: 1,1 % benzyl-alkohol) og deretter lagret ved 5 °C (lukkede symbol) eller 25 °C (åpne symbol). Prosenten nativt protein ble definert som maksimumsareal av nativt (ikke degradert) protein i forhold til det totale maksimumsareal målt ved kationbyttekromatografi.

Figur 7 viser stabiliteten av rekonstituert rhuMAb HER2 frysetørket i 5 mM histidin, pH 6,0, 38,4 mM mannitol, 20,4 mM sukrose, 0,01 % "Tween 20". Prøver ble rekonstituert med enten 4,0 ml (kvadrater) eller 20,0 ml (sirkler) BWFI(20 ml:0,9 % benzylalkohol; 4 ml:1,1 % benzylalkohol) og deretter lagret ved 5 °C (lukkede symboler) eller 25 °C (åpne symboler). Prosent nativt protein ble definert som maksimumsareal av nativt (ikke degradert) protein i forhold til det totale maksimumsareal målt ved kationbyttekromatografi.

Figur 8 viser stabiliteten av rekonstituert rhuMAb HER2 frysetørket i 10 mM natriumsuccinat, pH 5,0, 250 mM trehalose, 0,2 % "Tween 20". Prøver ble rekonstituert med 20,0 ml BWFI (0,9 % benzylalkohol) og deretter lagret ved 5 °C (●) eller 25 °C (○). Prosent nativt protein ble definert som maksimumsareal av nativt (ikke degradert) protein i forhold til det totale maksimumsareal målt ved kationbyttekromatografi.

Figur 9 viser aggregering av rhuMAb E25 formulert i buffere varierende fra pH 5 til pH 7 ved 10 mM bufferkonsentrasjon og 5 mg/ml antistoffkonsentrasjon. Prøver ble frysetørket, analysert ved tid 0 og etter 4, 8 og 52 ukers lagring ved 2-8 °C. Bufferne var: kaliumfosfat pH 7,0 (○); natriumfosfat pH 7,0 (□); histidin pH 7,0 (◇); natriumsuccinat pH 6,5 (●); natrium-succinat pH 6,0 (■); natriumsuccinat pH 5,5 (◇); og natriumsuccinat pH 5,0 (▲).

Figur 10 viser aggregering av rhuMAb E25 frysetørket i 5 mM histidinbuffer ved både pH 6 og pH 7 og analysert etter lagring som følger. Bufferene var: pH 6,0 lagret ved 2-8 °C (○); pH 6 lagret ved 25 °C (□); pH 6,0 lagret ved 40 °C (◇); pH 7 lagret ved 2-8 °C (●); pH 7 lagret ved 25 °C (■); og pH 7,0 lagret ved 40 °C (◆).

Figur 11 viser aggregering av 5 mg/ml rhuMAb E25 formulert i 10 mM

natriumsuccinat ved pH 5,0 med frysetørkingsbeskytter tilsatt ved en konsentrasjon på 275 mM (isoton). Frysetørkingsbeskytterne var: kontroll, ingen frysetørkingsbeskytter (○); mannitol (□); laktose (◇); maltose (●); trehalose (■); og sukrose (◆). Prøvene ble frysetørket og analysert ved tid lik 0 og etter 4, 8 og 52 ukers lagring ved 2 - 8 °C.

5 Figur 12 viser aggregering av 5 mg/ml rhuMAb E25 formulert i 10 mM natriumsuccinat ved pH 5,0 med frysetørkingsbeskytter tilsatt ved en konsentrasjon på 275 mM (isoton). Frysetørkingsbeskytterne var: kontroll, ingen frysetørkingsbeskytter (○); mannitol (□); laktose (◇); maltose (●); trehalose (■); og sukrose (◆). Prøvene ble frysetørket og analysert ved tid lik 0 og etter 4, 8 og 52 ukers lagring ved 40 °C.

10 Figur 13 viser hydrofobinteraksjonskromatografi ved 20 mg/ml rhuMAb E25 frysetørket i histidinbuffer ved pH 6 med en isoton konsentrasjon (dvs. 275 mM) av laktose lagret i 24 uker ved 2-8, 25 eller 40 °C og rekonstituert til 20 mg/ml.

15 Figur 14 viser hydrofobinteraksjonskromatografi av 20 mg/ml rhuMAb E25 frysetørket i histidinbuffer ved pH 6 lagret i 24 uker ved 2-8, 25 eller 40 °C og rekonstituert til 20 mg/ml.

Figur 15 viser hydrofobinteraksjonskromatografi av 20 mg/ml rhuMAb E25 frysetørket i histidinbuffer ved pH 6 med en isoton konsentrasjon (dvs. 275 mM) av sukrose og lagret i 24 uker ved 2-8, 25 eller 40 °C og rekonstituert til 20 mg/ml.

20 Figur 16 viser effekten av sukkerkonsentrasjonen på rhuMAb E25 formulert til 20 mg/ml i 5 mM histidin ved pH 6,0. Sukrose (●) og trehalose (□) ble tilsatt formuleringen ved molforhold varierende fra 0 til 2010 (isoton) (se tabell 1 nedenfor). Prøver ble frysetørket og analysert etter 12 ukers lagring ved 50 °C.

TABELL 1

Mol sukker : E25 antistoff	Sukkerkons. (mM)
0	0
260	34,4
380	51,6
510	68,8
760	103,1
1020	137,5
1530	206,3
2010	275

Figur 17 viser aggregering av rhuMAb E25 formulert til 25 mg/ml i 5 mM histidin ved pH 6 med 85 mM sukrose (O); 85 mM trehalose (□); 161 mM sukrose (◆) eller 161 mM trehalose (▲). Prøver ble frysetørket og lagret ved 2-8 °C etterfulgt av rekonstituering med 0,9 % benzylalkohol til 100 mg/ml antistoff i 20 mM histidin ved pH 6 med isoton (340 mM) og hyperton (644 mM) sukkerkonsentrasjon.

Figur 18 viser aggregering av rhuMAb E25 formulert til 25 mg/ml i 5 mM histidin ved pH 6 med 85 mM sukrose (O); 85 mM trehalose (□); 161 mM sukrose (◆) eller 161 mM trehalose (▲). Prøver ble frysetørket og lagret ved 30 °C etterfulgt av rekonstituering med 0,9 % benzylalkohol til 100 mg/ml antistoff i 20 mM histidin ved pH 6 med isoton (340 mM) og hyperton (644 mM) sukkerkonsentrasjon.

Figur 19 viser aggregering av rhuMAb E25 formulert til 25 mg/ml i 5 mM histidin ved pH 6 med 85 mM sukrose (O); 85 mM trehalose (□); 161 mM sukrose (◆) eller 161 mM trehalose (▲). Prøver ble frysetørket og lagret ved 50 °C etterfulgt av rekonstituering med 0,9 % benzylalkohol til 100 mg/ml antistoff i 20 mM histidin ved pH 6 med isoton (340 mM) og hyperton (644 mM) sukkerkonsentrasjon.

Detaljert beskrivelse av foretrukne utførelsesformer

I. Definisjoner

Med "protein" menes en sekvens av aminosyrer der kjedelengden er tilstrekkelig for å danne de høyere nivåer av tertiær og/eller kvaternær struktur. Dette er for å skille de fra "peptider" eller andre medikamenter med lav molekylvekt som ikke har slik struktur. Typisk vil proteinene her ha en molekylvekt på minst ca. 15-20 kD, fortrinnsvis minst ca. 20 kD.

Eksempler på proteiner omfattet av denne definisjon inkluderer pattedyrproteiner, slik som, f.eks. veksthormon, inkludert humant veksthormon og bovint veksthormon; veksthormonfrigjørende faktor; paratyreoidhormon; tyreoid-stimulerende hormon; lipoproteiner; α -1-antitrypsin; insulin A-kjede; insulin B-kjede; proinsulin; follikkelstimulerende hormon; kalsitonin; luteiniserende hormon; glukagon; koagulasjonsfaktorer som faktor VIIIC, faktor IX, vevsfaktor og von Willebrands faktor; anti-koagulasjonsfaktorer som protein C; atrialt natriuretisk faktor; lungesurfaktant; en plasminogenaktivator, slik som urokinase eller vevstype plasminogenaktivator (t-PA); bombazin; trombin; tumornekrosefaktor- α og - β ; enkefalinase; RANTES ("regulated on activation normally T-cell expressed and secreted"); humant makrofag-inflammatorisk protein (MIP-1- α); serumalbumin slik som humant serumalbumin; müllerian-inhiberende substans; relaxin A-kjede; relaxin B-kjede; prorelaxin; musegonadotropin-assosiert peptid; DNase; inhibin; aktivin; vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF); reseptorer for hormoner eller vekstfaktorer; et integrin; protein A eller D; reumatoide faktorer; en neurotrof faktor slik som benderivert neurotrof faktor (BDNF), neurotrofin-3,-4,-5, eller -6 (NT-3, NT-4, NT-5, eller NT-6), eller en nervevekstfaktor slik som NGF- β ; blodplatederivert vekstfaktor (PDGF); fibroblastvekstfaktor slik som aFGF og bFGF; epidermal vekstfaktor (EGF); transformerende vekstfaktor (TGF) som TGF- α og TGF- β , inkludert TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 eller TGF- β 5; insulinlignende vekstfaktor-I og -II (IGF-I og IGF-II); des(1-3)-IGF-I (hjerne IGF-I); proteiner som binder insulinlignende vekstfaktor; CD-proteiner som CD3, CD4, CD8, CD19 og CD20; erythropoietin (EPO); trombopoietin (TPO); osteoinduktive faktorer; immuntoksiner; et benmorfogenetisk protein (BMP); et interferon som interferon- α , - β , og - γ ; kolonistimulerende faktorer (CSF), f.eks. M-CSF, GM-CSF og G-CSF; interleukiner (IL), f.eks. IL-1 til IL-10; superoksiddismutase; T-cellerreseptorer; overflatemembranproteiner; nedbrytningsakselererende faktor (DAF); et viralt antigen som f.eks. en del av AIDS-kappen; transportproteiner; hjemstedsreseptorer; adressiner; regulatoriske proteiner; immunadhesiner; antistoffer; og biologisk aktive fragmenter eller varianter av en hvilken som helst av de ovenfor opplistede polypeptider.

Proteinet som formuleres er fortrinnsvis hovedsakelig rent og homogent

(dvs. fritt for kontaminerende proteiner etc.). Med "hovedsakelig rent" protein forstås en blanding inneholdende minst ca. 90 vektprosent av proteinet, basert på total vekt av blandingen, fortrinnsvis minst ca. 95 vektprosent. Med "hovedsakelig homogent" protein forstås en blanding inneholdende minst ca. 99 vektprosent protein, basert på total vekt av blandingen.

Proteinet er et antistoff. Antistoffet kan f.eks. bindes til et hvilket som helst av de ovenfor nevnte molekyler. Eksempelvis molekylære mål for antistoffer omfattet av den foreliggende oppfinnelse inkluderer CD-proteiner som CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 og CD34; medlemmer av HER-reseptorfamilien som EGF-reseptor, og HER2-, HER3- eller HER4-reseptor; celledhesjonsmolekyler som LFA-1, Mol, p150,-95, VLA-4, ICAM-1, VCAM og $\alpha\beta$ -integrin inkludert enten α - eller β -enhetene av denne (f.eks. anti-CD11a-, anti-CD18- eller anti-CD11b-antistoffer); vekstfaktorer som VEGF; IgE; blodtypeantigener; flk2/flt3-reseptor; fedme (OB)-reseptor; protein C etc.

Betegnelsen "antistoff" anvendes i videste betydning og dekker spesielt monoklonale antistoffer (inkludert hellengdeantistoffer som har en immunglobulin Fc-region), antistoffblandinger med polyepitopisk spesifisitet, bispesifikke antistoffer, "diabodies", og enkeltkjedete molekyler, så vel som antistofffragmenter (f.eks., Fab, F(ab')₂, og Fv).

Betegnelsen "monoklonale antistoffer" som her anvendes refererer til et antistoff fremskaffet fra en populasjon av i alt vesentlig homogene antistoffer dvs. de individuelle antistoffer som utgjør populasjonen er identiske med unntak av mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i små mengder. Monoklonale antistoffer er svært spesifikke ved å være rettet mot et enkelt antigen sete. Videre, i motsetning til konvensjonelle (polyklonale) antistoffremstillinger som typisk inkluderer ulike antistoffer rettet mot ulike determinanter (epitoper) er hvert monoklonalt antistoff rettet mot en enkel determinant på antigenet. I tillegg til deres spesifisitet, er monoklonale antistoffer fordelaktige ved at de syntetiseres av en hybridomkultur som ikke er forurenset av andre immunglobuliner. Spesifisering "monoklonal" antyder antistoffets egenskaper ved at de fremskaffes fra en i alt vesentlig homogen populasjon av antistoffer, og skal ikke oppfattes som om de krever produksjon av antistoffer ved en spesiell fremgangsmåte. De monoklonale antistoffene som skal anvendes i henhold til foreliggende oppfinnelse kan f.eks. dannes ved hybridometoden først beskrevet av Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1995) eller kan dannes ved rekombinante DNA-metoder (se f.eks. US patentskrift nr. 4 816 567). De "monoklonale antistoffene" kan også isoleres fra fagantistoffbiblioteker ved anvendelse av teknikkene beskrevet i f.eks. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) og Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

De monoklonale antistoffene her inkluderer særskilt "kimære" antistoffer

(immunglobuliner) der en del av den tunge og/eller lette kjeden er identisk med eller homolog med tilsvarende sekvens i antistoffer derivert fra en spesiell dyreart eller tilhørende en spesiell antistoffklasse eller subklasse, mens det gjenværende av kjeden(e) er identisk med eller homolog med tilsvarende sekvenser i antistoffer derivert fra en annen dyreart eller tilhørende en annen antistoffklasse eller subklasse, så vel som fragmenter av slike antistoffer, så lenge de fremviser den ønskede biologiske aktivitet (US patentskrift nr. 4 816 567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)).

"Humaniserte" former av ikke-humane (f.eks. murine) antistoffer er kimære immunglobuliner, immunglobulinkjeder eller fragmentene av disse, (slik som Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ eller andre antigenbindende sekvenser av antistoffer) som inneholder en minimums-sekvens derivert fra ikke-humant immunglobulin. For det meste er humaniserte antistoffer humane immunglobuliner (mottakerantistoff) der restene fra en komplementær determinerende region (CDR) fra mottakeren er erstattet med rester fra en CDR fra en ikke-human art (giverantistoff) som mus, rotte eller kanin som har den ønskede spesifisitet, affinitet og kapasitet. I noen tilfeller blir Fv-rester av strukturregion (FR) i det humane immunglobulin erstattet med tilsvarende ikke-humane rester. Videre kan humaniserte antistoffer omfatte rester som verken er funnet i mottakerantistoff eller i det importerte CDR eller strukturekvensene. Disse modifikasjonene er gjort for ytterligere å forbedre og optimalisere antistoffets ytelsesevne. Vanligvis vil det humaniserte antistoff omfatte i hovedsak alt av minst én, og typisk to variable domener, der alle eller i hovedsak alle av CDR-regionene tilsvarer de fra et ikke-humant immunglobulin og alle eller nesten alle av FR-regionene er fra en human immunglobulin-sekvens. Det humaniserte antistoff vil også eventuelt inneholde minst en del av en immun-globulin-konstantregion (Fc), typisk fra et humant immunglobulin. For flere detaljer, se Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); og Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). Humaniserte antistoffer omfatter et "Primatized"-antistoff, der den antigenbindende region til antistoffet er derivert fra et antistoff laget ved å immunisere makakaper med de interessante antigener.

En "stabil" formulering er en formulering hvor proteinene i hovedsak beholder den fysiske og kjemiske stabilitet og struktur ved lagring. Ulike analytiske teknikker for måling av proteins stabilitet er tilgjengelig innen fagområdet og gjennomgås i *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincen Lee Red., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, publisert (1991) og Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90 (1993). Stabilitet kan måles ved en utvalgt temperatur for en utvalgt tidsperiode. For rask screening, kan formuleringen oppbevares ved 40 °C i fra 2 uker til 1 mnd., ved hvilken tid stabiliteten måles. Der formuleringen skal lagres ved 2 - 8 °C, bør formuleringen generelt være stabil ved 30 °C eller 40 °C i minst 1 mnd. og/eller stabil

ved 2 - 8 °C i minst 2 år. Der formuleringen skal lagres ved 30 °C, bør formuleringen vanligvis være stabil i minst 2 år ved 30 °C og/eller stabil ved 40 °C i minst 6 mndr. Omfanget av aggregering etter frysetørring og lagring kan f.eks. brukes som en indikator på protein-stabilitet (se eksempler i det følgende). En "stabil" formulering kan f.eks.

5 være en formulering der mindre enn ca. 10 % og helst mindre enn ca. 5 % av proteinet er til stede som et aggregat i formuleringen. I andre utførelsesformer, kan en økning i aggregatdannelsen etter frysetørking og lagring av den frysetørkede formulering bestemmes. En "stabil" frysetørket formulering kan f.eks. være en formulering der økning i aggregat i den frysetørkede formulering er mindre enn ca. 5 % og helst mindre

10 enn ca. 3 %, når den frysetørkede formulering er lagret ved 2 - 8 °C i minst 1 år. I andre utførelsesformer, kan stabiliteten av proteinformuleringen måles ved anvendelse av en biologisk aktivitetsanalyse (se f.eks. eksempel 2 nedenfor).

En "rekonstituert" formulering er en formulering som har blitt tillaget ved å løse opp en frysetørket proteinformulering i et fortynningsmiddel slik at proteinet disper-

15 geres i den rekonstituerte formulering. Den rekonstituerte formulering er egnet for administrering (f.eks. parenteral administrering) til en pasient som skal behandles med proteinet av interesse og, i spesielle utførelsesformer av oppfinnelsen, kan være en som er egnet for subkutan administrering.

Det menes med "isoton" at formuleringen av interesse har tilnærmet det

20 samme osmotiske trykk som humant blod. Isotone formuleringer vil vanligvis ha et osmotisk trykk fra ca. 250 til 350 mOsm. Isotonisitet kan f.eks. måles ved bruk av et damptrykk- eller isfrysings-osmometer.

En "frysetørkingsbeskytter" er et molekyl som når det kombineres med et protein av interesse betydelig forhindrer eller reduserer kjemisk og/eller fysisk ustabilitet

25 av proteinet på grunn av frysetørking og etterfølgende lagring. Eksempler på frysetørkingsbeskyttere omfatter sukkere slik som sukrose eller trehalose; en aminosyre som mononatriumglutamat eller histidin; et metylamin som betain; et lyotrofisk salt som magnesiumsulfat; en polyol som treverdige eller høyere sukkeralkoholer, f.eks. glyserin, erytritol, glyserol, arabitol, xylitol, sorbitol og mannitol; propylenglykol;

30 polyetylglykol; "Pluronic"; og kombinasjoner av disse. Den foretrukne frysetørkingsbeskytter er et ikke-reduserende sukker, slik som trehalose eller sukrose.

Frysetørkingsbeskytteren blir tilsatt den prelyofiliserte formulering i en "frysetørkingsbeskyttende mengde", som betyr at proteinet etter frysetørking i nærvær av en frysetørkingsbeskyttende mengde av frysetørkingsbeskytteren i hovedsak beholder

35 sin fysiske og kjemiske stabilitet og struktur ved frysetørking og lagring.

"Fortynningsmiddelet" av interesse her er et som er farmasøytisk akseptabelt (trygg og ikke toksisk ved administrering til et menneske), og er nyttig ved tillaging av en rekonstituert formulering. Forslagsvise fortynningsmidler omfatter sterilt

vann, bakteriostatisk vann for injeksjon (BWFI), og en pH-bufret løsning (f.eks. fosfatbufret saltvann), steril salt-vannsløsning, Ringers løsning eller dekstroseløsning.

Et "konserveringsmiddel" er en forbindelse som kan tilsettes til fortynningsmiddelet for betydelig å redusere virkning av bakterier i den rekonstituerte formulering, og dermed gjøre det enklere å fremstille f.eks. en flerbruks rekonstituert formulering. Eksempler på potensielle konserveringsmidler omfatter oktadecyldi-metylbenzylammoniumklorid, hekso-metoniumklorid, benzalkoniumklorid (en blanding av alkylbenzyldimetylammoniumklorid der alkylgruppene er langkjedende forbindelser) og benzetoniumklorid. Andre typer konserveringsmidler omfatter aromatiske alkoholer som fenol, butyl- og benzylalkohol, alkylparabener slik som metyl- eller propylparaben, katekol, resorcinol, sykloheksanol, 3-pentanol, og m-kresol. Det mest foretrukne konserveringsmiddel i det følgende er benzylalkohol.

Et "fyllstoff" er en forbindelse som tilfører masse til den frysetørkede blanding, og bidrar til den fysiske struktur av den lyofiliserte kaken (f.eks. forenkler fremstillingen av en i hovedsak uniform lyofilisert kake som beholder en åpen porestruktur). Forslagsvise fyllstoffer omfatter mannitol, glysin, polyetylenglykol og sorbitol.

"Behandling" betegner både terapeutisk behandling og profylaktiske eller forebyggende tiltak. De som har behov for behandling omfatter de som allerede har en forstyrrelse, så vel som de der hensikten er å forhindre en forstyrrelse.

"Pattedyr" som det er til hensikt å behandle, betegner et hvilket som helst dyr klassifisert som et pattedyr, inkludert menneske, tamme dyr og husdyr, dyr i zoologiske hager og dyr som anvendes til sport, eller kjæledyr, slik som hunder, hester, katter, kuer etc. Det mest foretrukne pattedyret er menneske.

En "forstyrrelse" er en tilstand som vil ha nytte av behandling med proteinet. Dette omfatter kroniske og akutte forstyrrelser eller sykdommer omfattende de patologiske tilstander som predisponerer pattedyret for den omtalte forstyrrelse. Eksempler på forstyrrelser som behandles i det følgende omfatter karsinomer og allergier.

II. Utøvelse av oppfinnelsen

A. Proteinfremstilling

Proteinet som skal formuleres fremstilles ved anvendelse av teknikker som er vel etablerte innen fagområdet, inkludert syntetiske teknikker (slik som rekombinante teknikker og peptidsyntese, eller en kombinasjon av disse teknikker), eller proteinet kan isoleres fra en endogen proteinkilde. Det utvalgte protein er et antistoff. Teknikker for fremstilling av antistoffer følger.

(i) Polyklonale antistoffer.

Polyklonale antistoffer dannes vanligvis i dyr ved gjentakende subkutane

(sc) eller intraperitoneale (ip) injeksjoner av det relevante antigen og en adjuvans. Det kan være nyttig å konjugere det relevante antigen til et protein som er immunogent i den arten som skal immuniseres, f.eks. "keyhole limpet"-hemocyanin, serumalbumin, bovint tyroglobulin, eller soyabønnetrypsininhibitor ved anvendelse av et bifunksjonelt eller derivatiserende middel, f.eks. maleimidobenzoylsulfosuccinimidester (konjugering ved hjelp av cysteinrester), N-hydroksy-succinimid (ved hjelp av lysinrester), glutaraldehyd, ravsyreanhydrid, SOCl_2 eller $\text{R}'\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, der R og R' er ulike alkylgrupper.

Dyrene immuniseres mot antigenet, immunogene konjugater eller derivater ved å kombinere 1 mg eller 1 µg av peptidet eller konjugatet (for henholdsvis kaniner eller mus) med 3 volumenheter av Freund's fullstendige adjuvans. En måned senere blir dyret tilleggs-immunisert med 1/5 til 1/10 av den opprinnelige mengden av peptidet eller konjugatet i Freund's fullstendige adjuvans ved subkutan injeksjon på flere steder. 7 - 14 dager etter blir dyrene blodtappet og serumet analysert med hensyn på antistofftiter. Dyrene blir tilleggs-immunisert inntil titeren flater ut. Fortrinnsvis blir dyret tilleggsimmunisert med konjugat av det samme antigen, men konjugert til et forskjellig protein og/eller ved hjelp av et forskjellig kryssbindingsreagens. Konjugater kan også dannes i rekombinante cellekulturer som protein-fusjoneringsprosesser. Det er også nyttig å anvende aggregeringsmidler slik som alun for å øke immunresponsen.

(ii) *Monoklonale antistoffer.*

Monoklonale antistoffer fremskaffes fra en populasjon av i alt vesentlig homogene antistoffer, dvs. de individuelle antistoffer som omfatter populasjonen er identiske med unntak av mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i små mengder. Spesifiseringen "monoklonal" indikerer derfor den egenskap til antistoffet at det ikke er en blanding av atskilte antistoffer.

Monoklonale antistoffer kan f.eks. lages ved hjelp av hybridometoder først beskrevet ved Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975) eller de kan lages ved rekombinante DNA-metoder (U.S. patentskrift nr. 4 816 567).

Ved hybridometoden blir en mus eller andre tilfredsstillende vertsdyr slik som hamster, immunisert som ovenfor beskrevet for å utløse lymfocytter som produserer eller er i stand til å produsere antistoffer som vil bindes spesifikt til proteinet anvendt ved immunisering. Alternativt kan lymfocytene immuniseres *in vitro*. Lymfocytene fusjoneres da med myelomceller ved bruk av et egnet fusjoneringsmiddel, slik som polyetylenglykol, for å danne en hybridomcelle (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, s. 59-103 (Academic Press 1986)).

Hybridomcellene som dermed fremstilles blir sådd ut og dyrket i et egnet dyrkningsmedium som fortrinnsvis inneholder en eller flere substanser som inhiberer veksten eller overlevelsen av ikke-fusjonerte parentale myelomceller. Dersom de parentale myelomcellene f.eks. mangler enzymet hypoksantinguaninfosforibosyltrans-

ferase (HGPRT eller HPRT), vil vanligvis dyrkningsmediet for hybridomene inneholde hypoksantin, aminopterin og tymidin (HAT-medium), der substansene forhindrer veksten av HGPRT-manglende celler.

Foretrukne myelomceller er de som fusjonerer effektivt, medvirker til
 5 stabilt høyt produksjonsnivå av antistoffer fra de utvalgte antistoffproduserende celler, og som er følsomme overfor et medium som HAT-medium. Blant disse er foretrukne myelomceller murine myelom-linjer, slik som de derivert fra MOPC-21- og MPC-11-muse-tumorer tilgjengelig fra Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, og SP-2-celler tilgjengelig fra American Type Culture Collection,
 10 Rockville, Maryland USA. Humane myelomer og muse-humane hetero-myelomcellelinjer er også blitt beskrevet for produksjon av humane monoklonale antistoffer. (Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* s.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Dyrkningsmediet der hybridomceller dyrkes analyseres for produksjon av
 15 mono-klonale antistoffer rettet mot antigenet. Fortrinnsvis blir bindingsspesifisiteten til monoklonale antistoffer fremstilt i hybridomceller bestemt ved immunpresipitering eller ved en *in vivo* bindingsanalyse, slik som radioimmunanalyse (RIA) eller enzymbundet immunabsorbsjonsanalyse (ELISA).

Bindingsaffiniteten til monoklonale antistoff kan f.eks. bestemmes ved
 20 "Scatchard"-analysen til Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Etter at hybridomceller som produserer antistoffer av ønsket spesifitet, affinitet og/eller aktivitet er identifisert, kan kloner subklones ved begrensende fortynningsprosedyrer og dyrkes etter standard metoder. (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*.
 25 s. 59-103 (Academic Press, 1986)). Dyrkningsmedier som egner seg for dette formål omfatter f.eks. D-MEM- eller RPMI-1640-medium. Hybridomcellene kan i tillegg dyrket *in vivo* som ascitestumorer i et dyr.

De monoklonale antistoffene som utskilles fra subklonene blir
 hensiktsmessig atskilt fra dyrkningsmediet, ascitesvæsken, eller serum etter
 30 konvensjonelle immunglobulinrensefremgangsmåter slik som f.eks. protein A-Sepharose, hydroksylapatittkromatografi, gelelektroforese, dialyse, eller affinitetskromatografi.

DNA som koder for monoklonale antistoffer isoleres og sekvenseres enkelt ved hjelp av konvensjonelle fremgangsmåter (f.eks. ved anvendelse av oligonukleotidprober som er i stand til spesifikt å binde to gener som koder for den tunge
 35 og den lette kjededel av muse-antistoffer). Hybridomcellene fungerer som en foretrukken kilde av slikt DNA. Når det er isolert, kan DNA'et plasseres i ekspresjonsvektorer, som deretter transfekteres til en vertscelle slik som *E. coli*-celler, ape-COS-celler, ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO), eller myelomceller som for øvrig

ikke fremstiller immunglobulinprotein, for å oppnå syntese av monoklonale antistoffer i de rekombinante vertsceller. Oversiktsartikler gjeldende rekombinant ekspresjon i bakterier av DNA som koder for antistoff omfatter Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) og Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

5 Antistoffer kan isoleres fra antistoffagbibliotek dannet ved hjelp av teknikkene beskrevet i McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) og Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) beskriver isoleringen av henholdsvis murine og humane antistoffer ved hjelp av fagbiblioteker. Videre publikasjoner beskriver fremstillingen av høyaffinitets humane antistoffer (nM-område) med kjedeblanding (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992), så vel som kombinatorisk infeksjon og *in vivo* rekombinasjon som en strategi for å lage svært store fagbiblioteker (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Dermed er disse teknikker virkelige alternativer til tradisjonelle monoklonalantistoff-hybridomteknikker for isolering av monoklonale antistoffer.

15 DNA kan også endres ved f.eks. å substituere sekvensen som koder for human tung- og lettkjedekonstantregion på stedet til den homologe murine sekvens (U.S. patentskrift nr. 4 816 567; Morris, *et al.*, *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 81:6851 (1984) eller ved kovalent å binde til den immunglobulinkodende sekvens alle eller deler av den kodende sekvens fra et ikke-immunglobulinpolypeptid.

20 Vanligvis substitueres ikke-immunglobulinpolypeptider ved de konstante domener av et antistoff, eller de substitueres ved de variable domene av et antigenkombinerende sete av et antistoff for å danne et kimært, bivalent antistoff inneholdende et antigenkombinerende sete som har spesifisitet for et antigen, eller et annet antigenkombinerende sete som har spesifisitet for et annet antigen.

25 Kimære eller hybride antistoffer kan også fremstilles *in vitro* ved anvendelse av kjente fremgangsmåter innen syntetisk proteinkjemi, inkludert de som involverer kryssbindingsmidler. Immuntoksiner kan f.eks. lages ved hjelp av en disulfidutbyttereaksjon eller ved å danne en tioeterbinding. Eksempler på egnede reagenser for dette formål inkludere iminotiolat og metyl-4-merkaptobutyrimidat.

30 (iii) *Humaniserte og humane antistoffer.*

Fremgangsmåter for å humanisere ikke-humane antistoffer er vel kjente. Generelt har et humanisert antistoff en eller flere aminosyrerester introdusert i seg fra en kilde som er ikke-human. Disse ikke-humane aminosyrerester blir ofte betegnet som "importerte" rester, som typisk blir tatt fra et "importert" variabelt domene.

35 Humanisering kan i alt vesentlig utføres etter metoden av Winter og medarbeidere (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), ved å substituere gnager-CDR'er eller CDR-sekvenser fra tilsvarende sekvenser av et humant antistoff. Følgelig er

slike "humaniserte" antistoffer kimære antistoffer (U.S. patentskrift nr. 4 816 567), der vesentlig mindre enn et intakt humant variabelt domene er blitt substituert med den tilsvarende sekvens fra en ikke-human art. I praksis er humaniserte antistoffer vanligvis humane antistoffer der noen CDR-rester og muligens noen FR-rester er substituert med rester fra analoge steder i gnagerantistoffer. Valget av humane variable domener, både lette og tunge, for å lage humaniserte antistoffer er svært viktig for å redusere antigenisiteten. Ifølge den såkalte "best passende" metode blir sekvensen til det variable domene av et gnager-antistoff screenet mot hele biblioteket av kjente humane variable domenesekvenser. Den humane sekvensen som er nærmest den av gnageren blir så akseptert som det humane rammeverk (FR) for det humaniserte antistoff (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). En annen metode anvender et spesielt rammeverk avledet fra den anerkjente sekvens for alle humane antistoffer av en spesiell subgruppe av lette- eller tunge kjeder. Det samme rammeverk kan anvendes for mange forskjellige humaniserte antistoffer (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Det er videre viktig at antistoffer som humaniseres bibeholder høy affinitet for antigenet og andre gunstige biologiske egenskaper. Ifølge en foretrukken fremgangsmåte blir humaniserte antistoffer fremstilt, for å nå dette mål, ved en analytisk fremgangsmåte av parentalsekvensene og ulike konseptuelle humaniserte produkter ved anvendelse av tredimensjonale modeller av de parentale og humaniserte sekvenser. Tredimensjonale immunglobulinmodeller er allment tilgjengelige og er vel kjente for fagfolk. Dataprogrammer er tilgjengelig som illustrerer og viser mulige tredimensjonale konformasjonsstrukturer av utvalgte immun-globulinsekvenskandidater. Undersøkelse av disse fremviste strukturer tillater analyse av den antatte rolle resten har i funksjonen av immunglobulinsekvenskandidaten, dvs. analyse av resten som influerer evnen immunglobulinkandidaten har til å binde sitt antigen. På denne måten kan FR-rester utvelges og kombineres fra mottakeren og importsekvenser sånn at den ønskede antistoffkarakteristikk, slik som økt affinitet overfor målantigenet(ene), oppnås. Generelt er CDR-restene direkte og i alt vesentlig involvert i påvirkningen av antigenbinding.

Alternativt er det nå mulig å fremstille transgene dyr (f.eks. mus) som er i stand til, ved immunisering, å fremstille et fullt repertoar av humane antistoffer i fravær av endogen immunglobulinproduksjon. Det har f.eks. blitt beskrevet at homozygot fjerning av antistoff-tungkjedesammenkoplingsregion (J_H)-genet i kimære og kimlinjemutante mus resulterer i fullstendig inhibisjon av endogen antistoffproduksjon. Overføring av den humane kimlinjeimmunglobulingenrekken i slike kimlinjemutante mus vil føre til fremstilling av humane antistoffer ved påvirkning av antigen. Se f.eks., Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*,

362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993). Humane antistoffer kan også avledes fra fagdisplaybiblioteker (Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)).

(iv) *Bispesifikke antistoffer*

5 Bispesifikke antistoffer (BsAb) er antistoffer som har bindingsspesifisitet for minst to forskjellige epitoper. Slike antistoffer kan deriveres fra hellengdeantistoffer eller antistoffragmenter (f.eks. F(ab')₂-bispesifikke antistoffer).

Fremgangsmåter for å fremstille bispesifikke antistoffer er kjent innen fagområdet. Tradisjonell fremstilling av hellengde, bispesifikke antistoffer baseres på en
10 samtidig ekspresjon av to par tungkjede-lettkjede fra immunglobulin, der de to kjedene har ulik spesifisitet (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). På grunn av den tilfeldige sortering av immunglobulin tunge og lette kjeder, produserer disse hybridomene (kvadromene) en blanding av 10 mulige, ulike antistoffmolekyler, der bare en har den korrekte bispesifikke struktur. Opprensing av det korrekte molekyl, som
15 vanligvis utføres ved affinitetskromatografiske trinn, er svært tungvint, og produktutbyttet er lavt. Tilsvarende fremgangsmåter er beskrevet i WO 93/08829 og i Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

I henhold til en annen innfallsvinkel, fusjoneres variable domer av antistoffer med ønsket bindingsspesifisitet (antistoff-antigenbindende seter) med
20 konstante domenesequenser av immunglobulin. Fusjonen er fortrinnsvis med et konstant tungkjededomene av immun-globulin, omfattende minst deler av hengselregionene CH2 og CH3. Det er foretrukket at den første konstante tungkjederegion (CH1) inneholder bindingsstedet som er nødvendig for binding av lettkjede, til stede ved minst én av fusjonene. DNA som koder for fusjonene av immun-globulintungkjede og, hvis ønskelig,
25 innsettes immunglobulinlettkjede på separate ekspresjons-vektorer og kotransfekteres til en egnet vertsorganisme. Dette frembringer stor fleksibilitet ved tilpasning av gjensidige mengdeforhold av de tre polypeptidfragmentene i utførelsesformene når ulike forhold av de tre polypeptidkjeder anvendes ved oppbygging, og gir de optimale utbytter. Det er imidlertid mulig å sette inn de kodende sekvenser for to eller alle tre polypeptidkjedene i
30 én ekspresjonsvektor når ekspresjonen av minst to polypeptidkjeder i like mengder fører til høyt utbytte, eller når forholdet ikke er av spesiell betydning.

I en foretrukken eksempelform av denne innfallsvinkel, oppbygges de bispesifikke antistoffer av en hybrid immunglobulintungkjede med en første bindingsspesifisitet i en arm, og et hybrid immunglobulintungkjede-lettkjedepar (som
35 fremskaffer en annen bindingsspesifisitet) i den andre arm. Det ble funnet at denne asymmetriske struktur gjør det enklere å atskille den ønskede bispesifikke forbindelse fra uønskede immunglobulinkjedekombinasjoner, som tilstede-værelsen av en immunglobulinlettkjede som bare har halvparten av det bispesifikke molekyl, sørger for

en enkel separasjonsmåte. Denne tilnærming er beskrevet i WO 94/04690 publisert 3. mars 1994. For ytterligere detaljer ved fremskaffelse av bispesifikke antistoffer se f.eks. Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Bispesifikke antistoffer omfatter kryssbundne eller "heterokonjugerte" antistoffer. Ett av antistoffene i heterokonjugatet kan f.eks. kobles til avidin, det andre til biotin. Slike antistoffer har f.eks. blitt foreslått til målsøking med celler fra immunsystemet mot uønskede celler (US patentskrift nr.4 676 980), og for behandling av HIV-infeksjon(WO91/00360, WO 92/200373). Heterokonjugerte antistoffer kan lages ved anvendelse av en hvilken som helst passende kryssbindingsmetode. Egnede kryssbindingsmidler er vel kjente innen fagområdet, og er beskrevet i U.S. patentskrift nr. 4 676 980, sammen med et antall av kryssbindingsteknikker.

Fremgangsmåter for å danne bispesifikke antistoffer fra antistofffragmenter er også blitt beskrevet i litteraturen. De følgende fremgangsmåter kan også anvendes for fremstilling av bivalente antistofffragmenter som ikke nødvendigvis er bispesifikke. Fab'-fragmenter isolert fra *E. coli* kan f.eks. kobles kjemisk *in vitro* for å danne bivalente antistoffer. Se Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992).

Ulike fremgangsmåter for tillaging og isolering av bivalente antistofffragmenter direkte fra rekombinante cellekulturer er også blitt beskrevet. Bivalente heterodimere har f.eks. blitt fremstilt ved anvendelse leucin-glidelåser. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Leucin-glidelåsseptider fra Fos- og Jun-proteiner sammenkobles med Fab'-delene av to ulike antistoffer ved genfusjon. De homodimere antistoffer reduseres ved hengselregionen for å danne monomerer, og reoksidieres deretter for å danne heterodimere antistoffer. "Diabody"-teknologien beskrevet av Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) har fremskaffet en alternativ mekanisme for å lage bispesifikke/bivalente antistofffragmenter. Fragmentene omfatter et variabelt tungkjededomene (V_H) bundet til et variabelt lett kjededomene (V_L) med et koblingsreagens som er for kort for å tillate paring mellom de to domenene av samme kjede. Følgelig blir V_H - og V_L -domenene fra et fragment tvunget til å pare med de komplementære V_L - og V_H -domenene av et annet fragment, dermed dannes to antigenbindende seter. En annen strategi for å lage bispesifikke/bivalente antistofffragmenter med anvendelse av enkeltkjede Fv (sFv)-dimere er også blitt rapportert. Se Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

B. Fremstilling av lyofilisert formulering

Etter fremstilling av det interessante protein som beskrevet ovenfor, fremstilles en "prelyofilisert formulering". Mengden protein til stede i den prelyofiliserte formulering bestemmes når de ønskede dosevolumer, administrasjonsmåter etc. tas i betraktning. Der det utvalgte protein er et intakt antistoff (slik som et anti-IgE- eller

anti-HER2-antistoff), er forslagsvis proteinkonsentrasjoner å starte med fra ca. 2 mg/ml til ca. 50 mg/ml, fortrinnsvis fra ca. 5 mg/ml til ca. 40 mg/ml og helst fra ca. 20 -30 mg/ml. Proteinet er vanligvis til stede i løsning. Proteinet kan f.eks. være til stede i en pH-bufret løsning ved en pH fra ca. 4-8, og helst fra ca. 5-7. Eksempel på buffere

5 omfatter histidin, fosfat, Tris, citrat, succinat og andre organiske syrer.

Bufferkonsentrasjonen kan være fra ca. 1 mM til ca. 20 mM, eller fra ca. 3 mM til ca. 15 mM, avhengig av, f.eks. bufferen og den ønskede isotonisitet av formuleringen (f.eks. av den rekonstituerte formulering). Den foretrukne buffer er histidin fordi den som vist nedenfor, kan ha beskyttende egenskaper. Succinat ble vist å være en annen nyttig

10 buffer.

Frysetørkingsbeskytteren ble tilsatt den prelyofiliserte formulering. I foretrukne utførelsesformer, er frysetørkingsbeskytteren et ikke-reduserende sukker slik som sukrose eller trehalose. Mengden frysetørkingsbeskytter i den prelyofiliserte formulering er vanligvis slik at den resulterende formulering etter rekonstituering vil

15 være isoton. Imidlertid kan også hypertone rekonstituerte formuleringer være nyttige. I tillegg må ikke mengden av fryse-tørkingsbeskytter være for lav, slik at en uakseptabel mengde degradering/aggregering av proteinet oppstår ved frysetørrking. Der frysetørkingsbeskytteren er et sukker (slik som sukrose eller trehalose) og proteinet er et antistoff, er eksempler på konsentrasjoner av frysetørkings-beskytter i den prelyofiliserte

20 formulering fra ca. 10 mM til ca. 400 mM, og fortrinnsvis fra ca. 30 mM til ca. 300 mM, og helst fra ca. 50 mM til ca. 100 mM.

Forholdet mellom protein og frysetørkingsbeskytter velges for hver kombinasjon av protein og frysetørkingsbeskytter. I det tilfelle at det utvalgte protein er et antistoff og fryse-tørkingsbeskytteren er et sukker (f.eks. sukrose eller trehalose) som

25 gir en isoton rekonstituert formulering med en høy proteinkonsentrasjon, kan molforhold mellom frysetørkingsbeskytter og antistoff være fra ca. 100 til ca. 600 mol frysetørkingsbeskytter per 1 mol antistoff, og fortrinnsvis fra ca. 200 til ca. 600 mol frysetørkingsbeskytter til 1 mol antistoff.

I en foretrukket utførelsesform er det funnet å være fordelaktig å tilsette en

30 surfaktant til den prelyofiliserte formulering. Alternativt eller i tillegg kan surfaktanten tilsettes den lyofiliserte formulering og/eller den rekonstituerte formulering. Eksempler på surfaktanter omfatter ikke-ioniske surfaktanter slik som polysorbater (f.eks. polysorbat 20 eller 80); polyoksamerer (f.eks. poloksamer 188); Triton; natriumdodecylsulfat (SDS); natriumlaurylsulfat; natriumoktylglykosid; lauryl-, myristyl-,

35 , linoleyl- eller stearylsulfobetain; lauryl-, myristyl-, linoleyl- eller stearylsarkosin; linoleyl-, myristyl- eller cetylbetain; lauroamidpropyl-, kokamid-propyl-, linolamidopropyl-, myristamidpropyl-, palmidpropyl- eller isostearamidpropylbetain (f.eks. lauramidpropyl); myristamidpropyl-, palmidpropyl- eller isosteara-

midopropyldimetyl-amin; natriummetylkokoyl- eller dinatriummetyloleyltaurat; og "MONAQUAT"-serien (Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey), polyetylglykol, polypropylglykol og kopolymerer av etylen og propylenglykol (f.eks. Pluronic, PF68 etc.) Mengden surfaktant tilsatt er slik at den reduserer aggregering av det rekonstituerte protein og minimaliserer dannelsen av partikler etter rekonstituering. Surfaktanten kan f.eks. være til stede i den prelyofiliserte formulering i en mengde på ca. 0,001-0,5 %, og helst fra ca. 0,005-0,05 %.

I spesielle utførelsesformer av oppfinnelsen, anvendes en blanding av fryste-tørkingsbeskytteren (slik som sukrose eller trehalose) og et fyllstoff (f.eks. mannitol eller glysin) i fremstillingen av den prelyofiliserte formulering. Fyllstoffet kan legge til rette for fremstilling av en uniform lyofilisert kake uten for mange hulrom etc.

Andre farmasøytisk akseptable bærere, eksipienser eller stabilisatorer slik som de beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences 16. utgave Osol, A. red. (1980) kan inkluderes i den prelyofiliserte formulering (og/eller den frysetørkede formulering og/eller den rekonstituerte formulering) når det sørges for at de på den annen side ikke innvirker på formuleringens ønskede karakteristika. Akseptable bærere, eksipienser eller stabilisatorer er ikke-toksiske overfor mottaker i de anvendte doser og konsentrasjoner, og omfatter: ytterligere bufrende midler; konserveringsmidler; koløsningsmidler; antioksidanter inkludert askorbinsyre og metionin; chelaterende midler som EDTA; metallkomplekser (f.eks. Zn-proteinkomplekser); biodegraderbare polymerer slik som polyestere; og/eller saltdannende motion som natrium.

De herved beskrevne formuleringer kan også inneholde mer enn ett protein som er nødvendig for den spesielle indikasjon som behandles, fortrinnsvis de med komplementær aktivitet som ikke på skadelig vis påvirker det andre protein. Det kan f.eks. være ønskelig å fremskaffe to eller flere antistoffer som bindes til HER2-reseptoren eller IgE i en enkel formulering. Anti-HER2- og anti-VEGF-antistoffer kan videre kombineres i en formulering. Slike proteiner egner seg godt for å være til stede sammen i mengder som er effektive for formålet.

Formuleringene som skal anvendes til *in vivo*-administrering må være sterile. Dette er enkelt å oppnå med filtrering gjennom sterile filtreringsmembraner, før eller etter frysetørking og rekonstituering. Alternativt kan sterilitet av hele blandingen oppnås ved å autoklavere ingrediensene, med unntak av proteinet, ved ca. 120 °C i f.eks. ca. 30 minutter.

Formuleringen blir lyofilisert etter at protein, frysetørkingsbeskytter og andre valgfrie bestanddeler er blandet sammen. Mange forskjellige frysetørkere er tilgjengelige for dette formål slik som "Hull50" (Hull, USA) eller "GT20" (Leybold-Heraeus, Germany) frysetørkere. Frysetørking gjennomføres ved å nedfryse formuleringen og deretter sublimere is fra det nedfryste innhold ved en temperatur egnet for primær

tørking. Produkttemperaturen er under disse forholdene lavere enn eutektisk punkt eller kollapsestemperaturen til formuleringen. Vanligvis vil temperaturen ved primær tørking variere fra ca. -30 til 25 °C (forutsatt at produktet fortsetter å være nedfrosset under primær tørking) ved et egnet trykk, vanligvis varierende fra ca. 50 til 250 mTorr.

- 5 Formuleringen, størrelsen og typen beholder som inneholder prøven (f.eks. glassampull) og volumet av flytende stoff vil i hovedsak bestemme tiden som er nødvendig for tørking, som kan variere fra noen få timer til flere dager (f.eks. 40-60 t). Et sekundært tørkettrinn kan utføres ved ca. 0-40 °C, hovedsakelig avhengig av typen og størrelsen til beholderen, og typen protein som anvendes. Det ble imidlertid funnet her at et
- 10 sekundært tørkettrinn kanskje ikke er nødvendig. Temperaturen gjennom hele vannfjerningsfasen av lyofilisering kan f.eks. være fra ca. 15-30 °C (f.eks. ca. 20 °C). Tiden og trykket nødvendig for sekundær tørking vil være den som fremstiller en gunstig lyofilisert kake, avhengig f.eks. av temperaturen og andre parametere. Den sekundære tørkingstiden bestemmes av det ønskede gjenværende fuktighetsnivå i produktet og
- 15 typisk tar det minst ca. 5 timer (f.eks. 10-15 timer). Trykket kan være det samme som anvendes under det primære tørkettrinnet. Frysetørkingsbetingelsene kan varieres avhengig av formuleringen og ampullestørrelsen.

- Det kan i noen tilfeller være ønskelig å lyofilisere proteinformuleringen i beholderen der rekonstituering av proteinet skal utføres, i den hensikt å unngå et
- 20 overføringstrinn. I dette tilfelle kan beholderen f.eks. være en 3, 5, 10, 20, 50 eller 100 ml ampulle.

Som en generell påstand vil lyofilisering føre til en lyofilisert formulering der fuktighetsinnholdet er mindre enn ca. 5 %, og helst mindre enn ca. 3 %.

25 **C. Rekonstituering av den lyofiliserte formulering**

- På et egnet stadium, vanligvis når det er tid for å administrere proteinet til pasienten, kan den lyofiliserte formulering rekonstitueres med et fortynningsmiddel slik at proteinkonsentrasjonen i den rekonstituerte formulering er minst 50 mg/ml, f.eks. fra ca. 50 mg/ml til ca. 400 mg/ml, mer fordelaktig fra ca. 80 mg/ml til ca. 300 mg/ml, og
- 30 helst fra ca. 90 mg/ml til ca. 150 mg/ml. Slike høye proteinkonsentrasjoner i den rekonstituerte formulering er antatt å være spesielt nyttig når hensikten er å avlevere den rekonstituerte formulering subkutant. Ved andre administrasjonsmåter som intravenøs administrering kan imidlertid lavere konsentrasjoner av protein i den rekonstituerte formulering være ønskelig (f.eks. fra ca. 5-50 mg/ml, eller fra ca. 10-40 mg/ml protein i
- 35 den rekonstituerte formulering). I spesielle utførelsesformer er proteinkonsentrasjonen i den rekonstituerte formulering betydelig høyere enn den i den prelyofiliserte formulering. Proteinkonsentrasjonen i den rekonstituerte formulering kan f.eks. være ca. 2-40 ganger, fortrinnsvis 3-10 ganger og helst 3-6 ganger (f.eks. minst tre ganger eller

minst fire ganger) av den prelyofiliserte formulering.

Rekonstitueringen finner vanligvis sted ved en temperatur på ca. 25 °C for å sikre fullstendig hydratisering, selv om andre temperaturer kan anvendes hvis ønskelig. Tiden som kreves til rekonstituering vil avhenge av f.eks. typen

5 fortynningsmiddel, mengde eksipiens(er) og protein. Forslagsvise fortynningsmidler omfatter sterilt vann, bakteriostatisk vann for injeksjon (BWFI), en pH-bufret løsning (f.eks. fosfatbufret saltvann), steril saltvannsløsning, Ringers løsning eller dekstroseløsning. Fortynningsmiddelet kan eventuelt inneholde et konserveringsmiddel. Eksempler på konserveringsmidler er blitt beskrevet ovenfor, med aromatiske alkoholer
10 som benzyl- eller fenolalkohol som foretrukne konserveringsmidler. Mengden konserveringsmiddel anvendt bestemmes ved å vurdere ulike konserveringsmiddel-konsentrasjoner for kompatibilitet med proteinet, og testing av konserveringseffektiviteten. Hvis f.eks. konserveringsmiddelet er en aromatisk alkohol (som benzylalkohol), kan den være til stede i en mengde fra ca. 0,1-2,0 %, og fortrinnsvis fra ca. 0,5-1,5 %, 15 men helst ca. 1,0-1,2 %.

Den rekonstituerte formulering har helst mindre enn 6000 partikler per ampulle som er $\geq 10 \mu\text{m}$ i størrelse.

D. Administrering av den rekonstituerte formulering

20 Den rekonstituerte formulering administreres til et pattedyr som har behov for behandling med proteinet, fortrinnsvis et menneske, i henhold til kjente metoder, som intravenøs administrering som en bolus eller ved kontinuerlig infusjon over en tidsperiode, ved intramuskulær, intraperitoneal, intracerebrospinal, subkutan, intraartikulær, intrasynovial, intratekal, oral eller lokal administrering, eller ved
25 inhalsjon.

I foretrukne utførelsesformer administreres den rekonstituerte formulering til pattedyret ved subkutan (dvs. under huden) administrering. Formuleringen kan ved slike formål injiseres ved hjelp av en sprøyte. Annet utstyr for administrering av formuleringen er imidlertid tilgjengelig som injeksjonsanordninger (f.eks. "Inject-ease" 30 og "Genject" anordninger); injektorpenner (som "GenPen"; anordninger uten kanyle (f.eks. "MediJector" og "BioJector")); og subkutane flekkavleveringssystemer.

Den formålstjenlige dose ("terapeutiske effektiv mengde") av proteinet vil avhenge av f.eks. tilstanden som skal behandles, alvorlighetsgraden og utviklingen av tilstanden, enten proteinet administreres for preventive eller terapeutiske formål, 35 tidligere terapi, pasientens kliniske historie og respons overfor proteinet, typen protein anvendt, og aktsomhet fra den behandlende lege. Proteinene er egnet for administrering til pasienten en gang eller over en serie av behandlinger, og kan administreres til pasienten fra et hvilket som helst tidspunkt etter diagnostisering og fremover. Proteinene

kan administreres som helhetlig behandling eller i kombinasjon med andre medikamenter eller terapier nyttige i behandling av den aktuelle tilstand.

Der det valgte protein er et antistoff, er fra ca. 0,1-20 mg/kg en mulig startdose for administrering til pasienten, enten ved f.eks. en eller flere separate administreringer. Andre doseregimer kan imidlertid være nyttige. Forløpet av denne behandlingen overvåkes enkelt ved konvensjonelle teknikker. I tilfelle av et anti-HER2-antistoff kan en terapeutisk effektiv mengde av antistoffet administreres for å behandle eller forhindre kreft karakterisert ved en overekspresjon av HER2-reseptoren. Det er forventet at en rekonstituert formulering av anti-HER2-antistoff kan anvendes for behandling av bryst-, ovarie-, mage-, endometrie-, spyttkjertel-, lunge-, nyre-, tykktarm- og/eller blærekreft. Anti-HER2-antistoff kan f.eks. anvendes for å behandle karsinomer i anatomiske kanaler *in situ* (DCIS). Eksempelviser doser av anti-HER2-antistoff er i området 1-10 mg/kg med en eller flere separate administreringer.

Anvendelse av en anti-IgE-formulering omfatter terapi eller profylakse av f.eks. IgE-mediert allergisk sykdom, parasittinfeksjoner, interstitiell cystitt og astma. Avhengig av sykdommen eller forstyrrelsen som skal behandles administreres en terapeutisk effektiv mengde (f.eks. fra ca. 1-15 mg/kg) anti-IgE-antistoff til pasienten.

E. Artikler

I en annen utførelsesform av oppfinnelsen frembringes en artikkel som inneholder den lyofiliserte formulering ifølge foreliggende oppfinnelse, og instruksjoner for dens rekonstituering og/eller bruk er innbefattet. Artikkelen som fremstilles omfatter en beholder. Egnede beholdere inkluderer f.eks. flasker, ampuller (f.eks. to-kammerampuller), sprøyter (som to-kammersprøyte) og prøverør. Beholderen kan lages fra et utall materialer som glass eller plastikk. Beholderen inneholder den lyofiliserte formulering og merkingen på, eller i tilknytning til, beholderen kan antyde retningslinjer for rekonstituering og/eller bruk. Merkingen kan f.eks. antyde at den lyofiliserte formulering rekonstitueres til en proteinkonsentrasjon som beskrevet ovenfor. Merkingen kan videre angi at formuleringen er nyttig eller ment for subkutan administrering. Beholderen som inneholder formuleringen kan være en flerbruksvial, som muliggjør repeterte administreringer (f.eks. fra 2-6 administreringer) av den rekonstituerte formulering. Fremstilling av artikkelen kan videre omfatte en annen beholder inneholdende et egnet fortynningsmiddel (f.eks. BWF1). Ved blanding av fortynningsmiddelet og den frysetørkede formulering vil proteinets sluttkonsentrasjon i den rekonstituerte formulering vanligvis være minst 50 mg/ml. Fremstilling av artikkelen kan videre omfatte andre materialer fordelaktig fra et kommersielt standpunkt eller brukerstandpunkt, som inkluderer andre buffere, fortynningsmidler, filtre, kanyler, sprøyter og forpakkingsvedlegg med instruksjoner for bruk.

Oppfinnelsen vil bli mer fullstendig forstått ved henvisning til de følgende eksempler. De skal imidlertid ikke fortolkes som begrensende for omfanget av oppfinnelsen. Alle litteraturhenvisninger er innarbeidet ved referanse.

5

EKSEMPEL 1

ANTI-HER2-FORMULERING

Overekspresjon av HER2-proto-onkogenproduktet (p185^{HER2}) er blitt forbundet med en mengde aggressive humane maligniteter. Det murine monoklonale antistoff kjent som muMAb4D5 er rettet mot det ekstracellulære domene (ECD) til p185^{HER2}. muMAb4D5-molekylet er blitt humanisert for å forsøke og forbedre dets kliniske effektivitet ved å redusere immunogenisiteten, og å tillate det å støtte humane virkningsfunksjoner (se WO 92/22653). Dette eksempel beskriver utviklingen av en lyofilisert formulering inneholdende det humaniserte hellengdeantistoff huMAb4D5-8 beskrevet i WO 92/22653.

I utviklingen av en lyofilisert formulering blir eksipienser og buffere innledningsvis screenet ved å måle stabiliteten av proteinet etter lyofilisering og rekonstituering. Det lyofiliserte protein i hver formulering blir også gjenstand for akselererte stabilitetsstudier for å bestemme den mulige stabiliteten av proteinet i forhold til proteinets holdbarhet. Disse akselererte studiene blir vanligvis utført ved temperaturer høyere enn de antatte lagrings-betingelser, og dataene blir deretter anvendt for å estimere aktiveringsenergien for degraderingsreaksjonene antatt at de følger "Arrhenius"-kinetikk (Cleland *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4):307-377 (1993)). Aktiveringsenergien blir deretter anvendt for å beregne den forventede holdbarhet av proteinformuleringen ved de antatte lagringsbetingelser.

I tidlige screeningsstudier ble stabiliteten av flere lyofiliserte rekombinante humaniserte anti-HER2-antistoff(rhuMAb HER2)-formuleringer undersøkt etter inkubering ved 5 °C (antatt lagringsbetingelse) og 40 °C (akselerert stabilitetsbetingelse). I flytende tilstand ble det funnet at rhuMAb-HER2 degraderes ved deaminering (30Asn i lettkjede) og isoasparta-tdannelse via et sykklisk imidmellomprodukt, succinimid (102Asp i tungkjede). Deamideringen ble redusert til et minimum ved pH 5,0 medførende degradering hovedsakelig ved succinimid. Ved pH 6,0 ble det funnet noe større deaminering i den flytende proteinformulering. De lyofiliserte formuleringene ble derfor studert med: (a) 5 eller 10 mM succinatbuffer, pH 5,0 eller (b) 5 eller 10 mM histidinbuffer, pH 6,0. Begge bufferne inneholder surfaktanten polysorbat 20 ("Tween 20"), som ble anvendt for å redusere muligheten for aggregering av det rekonstituerte protein, og minimalisere dannelsen av partikler etter rekonstituering. Disse bufferne ble anvendt med eller uten ulike sukkere. Proteinene ble formulert i bufferen ved 5,0, 21,0 eller 25,0 mg/ml. Disse formuleringer ble deretter frysetørket og

undersøkt for proteinstabilitet etter 2 uker ved 5 °C og 40 °C. I frysetørkeren ble ampullene frosset ved en temperatur på -55 °C i ca. 5 timer etterfulgt av primær tørking ved en temperatur på 5 °C og 150 mTorr i 30 timer, og tørking til 1-2 % restfuktighet ble oppnådd med sekundær tørking ved en temperatur på 20 °C i 10 timer. Den viktigste
 5 degraderingsmåte for dette protein ved lyofilisering var aggregering, og derfor ble proteinstabiliteten undersøkt ved nativ størrelseseksklusionskromatografi for å måle gjenvinning av intakt nativt protein (% intakt protein i tabell 2 nedenfor).

De stabiliserende effekter av ulike frysetørkingsbeskyttende sukkerer på lyofilisert protein ble målt i 10 mM natriumsuccinat, pH 5,0 (tabell 2). Ved høye
 10 sukkerkonsentrasjoner (250-275 mM) og lav proteinkonsentrasjon (5,0 mg/ml) stabiliserer trehalose og laktose proteinet overfor aggregering av det lyofiliserte protein lagret i 2 uker ved 40 °C. Laktose, et reduserende sukker, ble imidlertid funnet å reagere med proteinet ved langtidslagring ved 40 °C. Formuleringene ved 5,0 mg/ml protein inneholdende enten sorbitol eller mannitol ga aggregert protein etter lagring ved 40 °C i
 15 2 uker. Ved høyere proteinkonsentrasjon (21,0 mg/ml) inneholdt formuleringene omfattende mannitol, eller mannitol i kombinasjon med sorbitol eller glysin, aggregert protein etter lyofilisering og lagring ved begge betingelser. I motsetning til dette forhindret trehalose og sukrose aggregering ved begge lagringsbetingelser.

250 mM trehalose- og 250 mM laktoseformuleringene ble undersøkt for
 20 langtidsstabilitet. Etter 9 måneder ved 40 °C eller 12 måneder ved 5 °C var det ingen forandringer i % intakt protein for trehaloseformuleringen. For laktoseformuleringen var % intakt protein konstant (likt som i utgangspunktet) etter 3 måneder ved 40 °C eller 6 måneder ved 25 °C. Trehaloseformuleringen kunne lagres ved regulert romtemperatur (15-30 °C) i 2 år uten betydelig forandring i % intakt protein.

Formuleringene med 10 mM histidin, pH 6,0 og mannitol inneholdt mindre aggregert protein etter lagring ved 40 °C i 2 uker enn formuleringen med 10 mM succinat, pH 5,0 og mannitol. Dette resultat kan settes i sammenheng med en noe stabiliserende effekt av histidin alene. Etter lagring ved 40 °C i 2 uker, var det imidlertid betydelig aggregering av histidin alene eller histidin/mannitolformuleringene.

30 Tilsetningen av sukrose i like mengder som mannitol (10 mg/ml av hver) i histidinformuleringen stabiliserte proteinet mot aggregering ved begge lagringsbetingelser. Anvendelse av glysin med mannitol forbedret ikke proteinstabiliteten, mens sukrose/glysinformuleringen ga samme stabilitet som sukrose/mannitolformuleringen. Disse resultatene indikerte videre at sukrose var nyttig for å forhindre aggregering av
 35 lyofilisert protein under lagring.

TABELL 2

Sammensetning før lyofilisering		% Intakt protein ^a		
[Protein] ^b (mg/ml)	Formulering	Væske (5 °C)	Lyofilisert (2 uker, 5 °C)	Lyofilisert (2 uker, 40 °C)
	10 mM natriumsuccinat pH 5,0			
5,0	275 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	98,9	99,1	98,9
5,0	275 mM laktose, 0,01 % "Tween 20"	96,8	96,5	96,6
5,0	275 mM sorbitol, 0,01 % "Tween 20"	99,4	99,3	95,4
5,0	250 mM mannitol, 0,01 % "Tween 20"	100,0	99,9	98,8
5,0	250 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	99,9	100,0
5,0	250 mM laktose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	100,0
21,0	250 mM trehalose, 0,2 % "Tween 20"	99,3	99,1	99,1
21,0	250 mM sukrose, 0,2 % "Tween 20"	99,6	99,6	99,7
21,0	250 mM mannitol, 0,01 % "Tween 20"	100,0	94,6	94,0
21,0	188 mM mannitol/63 mM sorbitol, 0,01 % "Tween 20"	99,8	98,6	96,5
21,0	250 mM mannitol/25 mM glysin, 0,01 % "Tween"	99,5	96,5	96,4
	10 mM histidin pH 6,0			
21,0	Uten sukker, 0,01 % "Tween 20"	100,0	99,9	98,9
21,0	54,9 mM mannitol, 0,01 % "Tween 20"	100,0	99,9	99,2
21,0	29,2 mM sukrose/266,4 mM glysin, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	99,6
21,0	54,9 mM mannitol/266,4 mM glysin, 0,01 % "Tween 20"	100,0	99,8	98,9
Sammensetning før lyofilisering		% Intakt protein		
[Protein] ^b	Formulering	Væske (5 °C)	Lyofilisert (2 uker, 5 °C)	Lyofilisert (2 uker, 40 °C)
21,0	54,9 mM mannitol/29,2 sukrose, 0,01 % "Tween 20"	99,8	100,0	99,7

a. Andelen av intakt protein ble målt ved nativ størrelseseksklusjons HPLC og maksimums-arealet av det native protein i forhold til totalt maksimumsareal inkludert aggregater (TSK3000 SW XL-kolonne, TosohHaas, med en gjennomstrøms hastighet på 1,0 ml/min; eluert med fosfatbufret saltvann; deteksjon ved 214 og 280 nm).

5 Proteinformuleringene ble analysert før frysetørking (væske, 5 °C) og etter lyofilisering og lagring ved 5 °C eller 40 °C i 2 uker.

10 b. Formuleringer inneholdende 5 mg/ml protein ble rekonstituert med destillert vann (20 ml, 5,0 mg/ml-protein), og formuleringer inneholdende 21 mg/ml protein ble rekonstituert med bakteriostatisk vann for injeksjon (BWFI, 0,9 % benzylalkohol; 20 ml, 20 mg/ml-protein).

Avlevering av en høy proteinkonsentrasjon kreves ofte ved subkutan administrering på grunn av volumbegrensningene ($\leq 1,5$ ml) og dosebehovene (≥ 100 mg). Høye proteinkonsentrasjoner (≥ 50 mg/ml) er imidlertid ofte vanskelige å oppnå i

15 produksjonsprosessen fordi proteinet har en tendens til å aggregere under prosessen ved høye konsentrasjoner, og blir vanskelig å håndtere (f.eks. pumpe) og sterilfiltrere.

Lyofiliseringsprosessen kan alternativt frembringe en fremgangsmåte som muliggjør konsentrering av proteinet. Proteinet fylles f.eks. på ampulle med et volum (V_f) og lyofiliseres deretter. Det lyofiliserte protein rekonstitueres deretter med et mindre volum

20 (V_r) vann eller konserveringsmiddel (f.eks. BWFI) enn det originale volum (f.eks. $V_r = 0,25V_f$) medførende en høyere proteinkonsentrasjon i den rekonstituerte løsning.

Denne fremgangsmåte resulterer også i konsentrering av buffere og ekspiensere. Ved subkutan administrering er det ønskelig at løsningen er isoton.

25 Mengden trehalose i lyofilisert rhuMAb-HER2 ble redusert for å fremstille en isoton løsning på 100 mg/ml protein etter rekonstituering. Den stabiliserende effekt av trehalose ble bestemt som funksjon av konsentrasjon for 5 mM natriumsuccinat, pH 5,0 og 5 mM histidin, pH 6,0 ved 25,0 mg/ml protein (tabell 3). Ved trehalose-konsentrasjoner fra 60 til 200 mM, var det ingen signifikant aggregering etter inkubering av det lyofiliserte protein i 4 uker ved 40 °C. Disse formuleringer ble rekonstituert med 20

30 ml bakteriostatisk vann for injeksjon (BWFI, USP, 0,9 % benzylalkohol). Rekonstituering av 50 mM trehaloseformulering (5 mM natriumsuccinat) med 4 ml BWFI (100 mg/ml protein) etter inkubering i 4 uker ved 40 °C medførte en svak økning i aggregatdannelsen. De konserverte rekonstituerte formuleringer frembrakte fordelene av flere uttak fra samme ampulle uten sterilitetsbekymringer. Når det benyttes sterile kanyler vil

35 disse formuleringer tillate flere doser fra en enkelt vial.

TABELL 3

Sammensetning for lyofilisering		% Intakt protein ^a		
[Protein] (mg/ml)	Formulering	Væske (5 °C)	Lyofilisert (4 uker, 5 °C)	Lyofilisert (4 uker, 40 °C)
	5 mM natriumsuccinat pH 5,0			
25,0	50 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	99,5
25,0	60 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	99,9
25,0	60 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	99,2
25,0	100 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	99,7
25,0	150 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	99,8
25,0	200 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	100,0
	5 mM histidin pH 6,0			
25,0	38,4 mM mannitol/20,4 mM sukrose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	99,3
25,0	38,4 mM mannitol/20,4 mM sukrose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	99,4
25,0	60 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	99,8
25,0	60 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	99,4
25,0	100 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	99,6
25,0	150 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	100,0
25,0	200 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"	100,0	100,0	100,0

- a. Andelen intakt protein ble målt ved nativ størrelseseksklusjons HPLC og definert som maksimumsareal av nativt protein i forhold til totalt maksimumsareal inkludert aggregater (TSK3000 SW XL-kolonne, TosohHaas, med en gjennomstrøms hastighet på 1,0 ml/min; eluering med fosfatbufret saltvann; deteksjon ved 214 og 280 nm). Proteinformuleringene ble analysert før lyofilisering (væske, 5 °C og etter frysetørking og lagring ved 5 °C eller 40 °C i 4 uker. Formuleringene ble rekonstituert med bakteriostatisk vann for injeksjon (BWFI, USP, 0,9 vekt% benzylalkohol; 20 ml, 22 mg/ml protein).
- b. Rekonstituert med 4 ml BWFI (0,9 % benzylalkohol) for å gi 100 mg/ml protein.
- c. Rekonstituert med 4 ml BWFI (1,1 % benzylalkohol) for å gi 100 mg/ml protein.
- d. Prøver inkubert i 2 uker ved 5 °C eller 40 °C og deretter rekonstituert med 20 ml BWFI (0,9 % benzylalkohol) for å gi 22 mg/ml protein.

For tiden undersøkes rhuMab-HER2 som et terapeutisk middel for behandling av brystkreft. Proteinet doseres til pasientene ved 2 mg/kg på ukentlig basis. Siden gjennomsnittlig vekt av disse pasientene er 65 kg er den gjennomsnittlige ukentlige dose 130 mg rhuMab-HER2. Ved subkutan administrering tolereres fint injeksjonsvolum på 1,5 ml eller mindre, og proteinkonsentrasjonen for ukentlig subkutan administrering av rhuMab-HER2 kan derfor godt være ca. 100 mg/ml (130 mg gjennomsnittlig dose/1,5 ml). Som nevnt ovenfor er denne høye protein-konsentrasjon vanskelig å produsere og beholde i en stabil form. For å oppnå denne proteinkonsentrasjon formuleres rhuMab-HER2 i: (a) 5 mM natriumsuccinat, pH 5,0 eller (b) 5 mM histidin, pH 6,0, og ble lyofilisert ved 25 mg/ml protein i 60 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20". Frysetørkingen ble utført ved å fylle 18 ml proteinformulering på 50 ml vial. I frysetørkeren ble ampullene frosset ved en temperatur på -55 °C i ca. 5 timer etterfulgt av primær tørking ved en temperatur på 5 °C og 150 mTorr i 30 timer, og tørking til 1-2 % restfuktighet ble oppnådd med sekundær tørking ved en temperatur på 20 °C i 10 timer. Termoelementer plassert i vialene inneholdende placebo (formulering uten protein) indikerte at produktet i ampullene ble holdt under -10 °C gjennom den primære tørkingen. Sekvensielle avbruddsstudier under lyofilisering viste at restfuktigheten etter primærtørkingen vanligvis var mindre enn 10 %.

Det lyofiliserte protein ble deretter rekonstituert med enten 4 eller 20 ml BWFI (0,9 eller 1,1 % benzylalkohol) for å gi konsentrerte proteinløsninger:

- (a) 4 ml: 102 mg/ml rhuMab-HER2, 245 mM trehalose, 21 mM natriumsuccinat, pH 5,0 eller 21 mM histidin, pH 6,0, 0,04 % "Tween 20";
- (b) 20 ml: 22 mg/ml rhuMab-HER2, 52 mM trehalose, 4 mM natriumsuccinat, pH 5,0 eller 4 mM histidin, pH 6,0, 0,009 % "Tween 20".

Etter lagring av de lyofiliserte formuleringer i 4 uker ved 40 °C og rekonstituering til 22 mg/ml protein, så det ut til at mengden aggregert protein økte svakt med reduksjon i trehalosekonsentrasjon. Stabiliteten av det lyofiliserte protein ble ikke påvirket av rekonstitueringsvolumet. Som vist i fig. 1, var mengden intakt protein etter inkubering av lyofilisert protein ved 40 °C den samme for 60 mM trehalose, 5 mM natriumsuccinat, pH 5,0, 0,01 % "Tween 20" formulering rekonstituert med enten 4 eller 20 ml BWFI.

Resultatene vist i tabell 3 antyder at det kan være en sammenheng mellom trehalosekonsentrasjon og proteinstabilitet. For videre å vurdere denne sammenhengen ble formuleringer inneholdende konsentrasjoner av trehalose formulert i enten natriumsuccinat eller histidin inkubert i 91 dager ved 40 °C. Stabiliteten ble deretter målt som en funksjon av molforholdet mellom trehalose og protein for hver konsentrasjon av trehalose. Som vist i fig. 2, reduseres protein-stabiliteten tydelig med reduserende trehalosekonsentrasjon for begge formuleringer. Det var ingen tydelig forskjell mellom de to bufferne succinat og histidin i disse formuleringene. Dermed antas det at den primære stabilisator ved disse betingelser er trehalose. Den observerte reduksjon i intakt protein for begge disse formuleringer ville i tillegg bli godkjent selv ved den lave trehalosekonsentrasjon for en formulering som er lagret ved 2-8 °C i den tiden den er holdbar. Hvis imidlertid regulert stabil romtemperatur (30 °C maksimumstemperatur) påkreves, kan høyere trehalose-konsentrasjoner ($\geq 600:1$ trehalose: protein) være nødvendig avhengig av stabilitetsspesifikasjonene for produktet (dvs. spesifikasjon for mengden intakt protein gjenværende etter 2 års lagring). En regulert romtemperaturlagringsbetingelse vil typisk kreve stabilitet i 6 måneder ved 40 °C som er ekvivalent med lagring ved 30 °C i 2 år.

Som vist i figur 3 var 250 mM trehaloseformulering uforandret etter 6 måneder ved 40 °C, mens begge 60 mM trehaloseformuleringene var mindre stabile. 60 mM trehaloseformuleringene kan derfor kreve kjølig lagring hvis produktspesifikasjonene ved slutten av dens holdbarhet f.eks. er $>98\%$ intakt protein ved nativ størrelseseksklusions-kromatografi.

I den tidligere screeningsstudie ble det observert at sukrose hindret aggregering av rhuMab-HER2 etter lyofilisering og etterfølgende lagring. For å oppnå isotone løsninger etter rekonstituering for subkutan administrering (ca. fire ganger konsentrering av formuleringsbestanddelene og protein), må sukrosekonsentrasjonen reduseres betydelig. Den samme massekonsentrasjon av sukrose og mannitol (fyllstoff) anvendt i screeningsstudiene forhindret aggregering av proteinet. En lavere konsentrasjon av sukrose og mannitol (like massekonsentrasjoner) ble valgt som en potensiell subkutan formulering av rhuMab-HER2. Proteinløsningen (25 mg/ml protein, 5 mM histidin, pH 6,0, 38,4 mM (7 mg/ml) mannitol, 20,4 mM (7 mg/ml) sukrose, 0,01 % "Tween 20") ble frysetørket på samme måte som 60 mM trehaloseformuleringen med unntak av at den primære tørkesyklus ble forlenget til 54 timer. Etter 4 uker ved 40 °C var den en svak økning i mengden aggregater etter rekonstituering med 4,0 eller 20,0 ml BWFI (tabell 3). Mengden aggregert protein var den samme for rekonstituering ved 22 eller 100 mg/ml protein (figur 4). Mannitol/sukroseformuleringen ga på samme måte som 60 mM trehalose-formuleringene mindre intakt protein over tid ved 40 °C. Molforholdet mellom sukrose og protein for denne formulering var 120 til 1, hvilket

antyder at mannitol/sukrose-kombinasjonen kan være mer effektiv enn trehalose alene ved det samme molforhold av stabiliserende sukker (fig. 2 og 4).

I tidligere eksempler ble stabiliteten av de lyofiliserte rhuMab-HER2-formuleringene bestemt som en funksjon av temperatur. Disse studiene viste at trehalose- og mannitol/sukroseformuleringer hindret degradering av proteinet i lyofilisert form ved høye temperaturer (40 °C). Disse eksperimentene vedrørte imidlertid ikke stabiliteten av proteinet etter rekonstituering og lagring. Med en gang de lyofiliserte rhuMab-HER2-formuleringene rekonstitueres med BWFI kan de anvendes ved gjentatte administreringer av medikamentet. Formen på ampullen (450 mg rhuMab-HER2) ble spesielt utformet for å frembringe tre doser til en gjennom-snittspasient (130 mg rhuMab-HER2 per dose). Siden medikamentet doseres ukentlig kan ampullen lagres minst tre uker etter rekonstituering. For å sikre at rhuMab-HER2 fortsatt er stabil etter rekonstituering, ble stabilitetsstudier på rekonstituerte rhuMab-HER2-formuleringer utført ved 5 °C og 25 °C.

Formuleringene ble rekonstituert til 100 mg/ml (4 ml BWFI) for subkutan administrering. Ved denne høye proteinkonsentrasjon kan proteinet være mer utsatt for aggregering enn den intravenøse doseform som ble rekonstituert til 22 mg/ml protein (20 ml BWFI). De fire rhuMab-HER2-formuleringer fra det tidligere eksempel ble undersøkt for aggregering (tap av intakt protein). Som vist i tabellene fra 4 til 6 var det ingen forskjell i stabilitet for formuleringene rekonstituert til 22 og 100 mg/ml protein. Videre beholdt disse formuleringer proteinet fullstendig intakt i opptil 90 dager ved 5 °C og 30 dager ved 25 °C, hvilket antyder at det rekonstituerte protein kan lagres avkjølt i minst 90 dager. Forskjellig fra det lyofiliserte proteins stabilitet i det tidligere eksempel påvirket ikke trehalosekonsentrasjonen i formuleringen proteinstabiliteten (tabell 7).

TABELL 4

Stabilitet av de rekonstituerte formuleringer av rhuMab-HER2 lyofilisert ved 25 mg/ml protein i 5 mM natriumsuccinat, pH 5,0, 60 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"

Tid (dager)	% Intakt protein			
	22 mg/ml protein		100 mg/ml protein	
	5 °C	25 °C	5°C	25 °C
0	99,9	99,9	99,7	99,7
14	ND	100,0	ND	100,0
30	100,0	100,0	100,0	100,0
91	99,8	ND	100	ND

Prøvene ble rekonstituert med 4,0 eller 20,0 ml BWFI (1,1 % eller 0,9 % benzylalkohol), og deretter lagret ved 5 °C eller 25 °C. Prosenten intakt protein ble definert som andelen av nativt maksimumsareal og målt ved nativ størrelses-eksklusionskromatografi. ND=ikke bestemt.

TABELL 5

Stabilitet av de rekonstituerte formuleringer av rhuMab-HER2 lyofilisert ved 25 mg/ml protein i 5 mM histidin, pH 6,0, 60 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20"

Tid (dager)	% Intakt protein			
	22 mg/ml protein		100 mg/ml protein	
	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C
0	100,0	100,0	100,0	100,0
14	ND	100,0	ND	100,0
31	99,3	99,7	100,0	100,0
61	100,0	ND	ND	ND

Prøvene ble rekonstituert med 4,0 eller 20,0 ml BWFI (1,1 % eller 0,9 % benzylalkohol), og deretter lagret ved 5 °C eller 25 °C. Prosenten intakt protein ble definert som andelen av nativt maksimumsareal og målt ved nativ størrelses-eksklusionskromatografi. ND=ikke bestemt.

TABELL 6

Stabilitet av de rekonstituerte formuleringer av rhuMab-HER2 lyofilisert ved 25 mg/ml protein i 5 mM histidin, pH 6,0, 38,4 mM mannitol, 20,4 mM sukrose, 0,01 % "Tween 20"

Tid (dager)	% Intakt protein			
	22 mg/ml protein		100 mg/ml protein	
	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C
0	99,7	99,7	99,8	99,8
14	ND	100,0	ND	99,8
31	100,0	100,0	100,0	100,0
92	100,0	ND	100,0	ND

Prøvene ble rekonstituert med 4,0 eller 20,0 ml BWFI (1,1 % eller 0,9 % benzylalkohol), og deretter lagret ved 5 °C eller 25 °C. Prosenten intakt protein ble definert som andelen av nativt maksimumsareal og målt ved nativ størrelses-eksklusionskromatografi. ND=ikke bestemt.

TABELL 7

Stabilitet av de rekonstruerte formuleringer av rhuMab-HER2 lyofilisert ved 21 mg/ml protein i 10 mM natriumsuccinat, pH 5,0, 250 mM trehalose, 0,2 % "Tween 20"

Tid (dager)	% Intakt protein	
	5 °C	25 °C
0	99,8	99,8
14	ND	100,0
31	99,9	99,4
92	99,8	ND

Prøvene ble rekonstituert med 20,0 ml BWFI (0,9 % benzylalkohol), og deretter lagret ved 5 °C eller 25 °C. Prosenten intakt protein ble definert som andelen av nativt maksimumsareal og målt ved nativ størrelseseksklusjonskromatografi. ND=ikke bestemt.

Som tidligere nevnt er hoveddegraderingsveien for rhuMab-HER2 i vandig løsning deamidering eller succinimiddannelse. Tapet av nativt protein på grunn av deamidering eller succinimiddannelse ble undersøkt for de fire rekonstituerte rhuMab-HER2-formuleringer.

Analyse av rhuMab-HER2-deamidering og -succinimiddannelse ble utført ved anvendelse av kationebyttekromatografi. En "Bakerbond Wide-Pore Carboxy Sulfon (CSX)"-kolonne (4,6 x 250 mm) ble kjørt med en gjennomstrøms hastighet på 1 ml/min. Den mobile fasens buffere var (A) 0,02 M natriumfosfat, pH 6,9, og (B) 0,02 M natriumfosfat, pH 6,9, 0,2 M NaCl. Kromatografien ble deretter utført ved 40 °C som følger:

TABELL 8

Tid	% Buffer B
0	10
55	45
57	100
62	100
62,1	10
63	10

Maksimumseluering ble overvåket ved 214 nm og 75 µg protein ble applisert for hver analyse.

Igjen var det ingen forskjeller i stabilitet av formuleringene rekonstituert til 22 og 100 mg/ml protein (figurene 5 til 7). Proteindegraderingen var hurtigere ved 25 °C enn 5 °C for hver formulering, og degraderingshastigheten var sammenlignbar for alle formuleringene lagret ved 5 °C. Formuleringene inneholdende histidin hadde en litt høyere degraderingshastighet ved 25 °C enn succinatformuleringene. Mengden trehalose i formuleringen påvirket ikke degraderingshastigheten ved noen temperatur (fig. 5 og 8). Disse resultater antyder at disse fire formuleringer frembringer en akseptabel degraderingshastighet under nedkjølte lagringsbetingelser (5 °C) over den hensiktsmessige periode for anvendelse (30 dager etter rekonstituering med BWFI).

Flerbruksformuleringene bør bestå effektivitetstestene for konserveringsmidler beskrevet av US Pharmacopeia (USP) for anvendelse i USA. Den frysetørkede formulering av rhuMab-HER2 inneholdende 25 mg/ml protein, 5 mM histidin, pH 6,0, 60 mM trehalose, 0,01 % "Tween 20" ble rekonstituert med 20 ml benzylalkohol ved konsentrasjoner mellom 0,9 og 1,5 vekt%. For konsentrasjoner på eller over 1,3 vekt%, ble rekonstitueringsløsningen uklar etter inkubering over natten ved romtemperatur (tilnærmet 25 °C). Rekonstituering med standard BWFI-løsning (0,9 % benzylalkohol) resulterte i en løsning som ikke alltid bestod testene som utfordret konserveringen. Rekonstituering med 1,0 eller 1,1 % benzylalkohol var imidlertid begge forenlige med formuleringen og passerte testene som utfordret konserveringen. Produsentenes spesifikasjon for løsningen krever et område på $\pm 10\%$, og derfor blir de lyofiliserte formuleringer rekonstituert med 1,1 % benzylalkohol ($1,1 \pm 0,1\%$).

En enkeltrinns lyofiliseringssyklus for rhuMab-HER2-formuleringen er utviklet. I enkeltrinns lyofiliseringssyklusen, ble rhuMab-HER2 ved 25 mg/ml, 60 mM trehalose, 5 mM histidin pH 6 og 0,01 % polysorbat 20 lyofilisert ved en temperatur på 20 °C, og et trykk på 150 mTorr. Etter 47 timer var det gjenværende fuktighets-innhold i den lyofiliserte kake mindre enn 5 %. Denne lyofiliseringssyklus betraktes å være nyttig fordi den forenkler produksjonsprosessen ved å eliminere det sekundære tørkettrinns.

EKSEMPEL 2

ANTI-IgE-FORMULERING

IgE-antistoffer bindes til spesifikke høyaffinitetsreseptorer på mastceller, førende til mastcelledegranulering og frigjøring av mediatorer, som histamin som frembringer symptomer forbundet med allergi. Derfor er anti-IgE-antistoffer som blokkerer bindingen av IgE til dets høyaffinitetsreseptor av potensiell terapeutisk verdi i behandling av allergi. Disse antistoffer må altså ikke bindes til IgE når IgE er bundet til reseptoren, fordi det vil sette i gang histaminfrigjøring. Dette eksemplet beskriver utviklingen av en lyofilisert formulering omfattende humanisert hellengde-anti-IgE-antistoff-MaE11 beskrevet i Presta *et al. J. Immunology*, 151:2623-2632 (1993).

Materialer: Høyt rensset rhuMAb-E25 (rekombinant humanisert anti-IgE-antistoff-MaE11) som ikke inneholdt "Tween 20" ble anvendt i formuleringene beskrevet nedenfor. Spectra/Por 7 dialysemembraner ble levert fra Spectrum (LosAngeles, CA). Alle andre reagenser anvendt i denne studie ble anskaffet fra kommersielle kilder og var av analytisk kvalitet. Formuleringsbuffere og kromatografimobilfase ble fremstilt ved å blande passende mengder av buffer og salt med Milli-Q-vann i en volumetrisk kolbe.

Formulering: E25 S Sepharose-"pool" ble dialysert med formuleringsbuffere som spesifisert. Dialyse ble utført med et minimum på 4 x 2l bufferbytter over en 48 timers periode ved 2 - 8 °C. Frysetørkingsbeskytter ble tilsatt etter dialysen til noen av formuleringene etter behov. Proteinkonsentrasjon etter dialyse ble bestemt ved UV-spektroskopi ved anvendelse av en molabsorptivitet på 1,60. Det dialyserte protein ble fortynnet til en på forhånd bestemt formuleringskonsentrasjon med en passende formuleringsbuffer, steriltfiltrert ved anvendelse av et 0,22 µm Millex-GV-filter (Millipore) og fylt på på forhånd vaskede autoklaverte glassvialer. Vialene ble korket med silikoniserte teflonfrysetørkingskorker og lyofilisert under følgende betingelser: E25-formuleringen ble nedfrost til -55 °C ved 80 °C per time og innholdet i vialen ble holdt frosset i 4 timer. Temperaturen ble hevet til 25 °C ved 10 °C/time ved primær tørking. Primær tørking ble utført ved 25 °C, 50 µ vakuumpykk i kammeret 39 timer, slik at gjenværende fuktighet i lyofilisert kake var 1-2 %. Etter frysetørking ble en ampulle fra hver formulering fjernet for t=0 analyse og de gjenværende vialene ble lagret ved ulike temperaturer som inkluderte -70 °C, 2-8 °C, 25 °C, 30 °C (regulert romtemperatur) 40 °C og 50 °C.

Kromatografi: Nativ størrelseseksklusjonskromatografi ble utført på en "Bio-Rad Bio-Select SEC 250-5"-kolonne (300 x 7,8). Kolonnen ble ekvilibrert og gjennomkjørt i PBS med en gjennomstrøms hastighet på 0,5 ml/min ved anvendelse av en "Hewlett Packard 1090L" HPLC utstyrt med en diodeseriedetektor. Molekylvektstandarder (Bio-Rad, Inc.) bestående av tyroglobulin (670 kD), gammaglobulin (158 kD), ovalbumin (44 kD) og cyanokobalamin (1,35 kD) ble brukt for å kalibrere kolonnen. Den appliserte prøve var 25 mg og protein ble påvist ved å overvåke UV-absorpsjonen ved 214 nm ved bruk av dataprogrammet "Turbochrom 3" (PE Nelson, Inc.).

Hydrofobinteraksjonskromatografi: F(ab')₂-fragmenter av E25-antistoffet ble kromatografert ved anvendelse av en "Toso-Haas Butyl-NPR"-kolonne (3,5 x 4,6 mm) og en "Hewlett Packard 1090L"-HPLC utstyrt med diodeseriedetektor. Elueringsbuffer A var: 20 mM Tris, 2 M ammoniumsulfat, 20 volum% glyserol, pH 8,0, mens elueringsbuffer B var: 20 mM Tris, 20 volum% glyserol, pH 8,0. Kolonnen ble ekvilibrert med 10 % elueringsbuffer B med en gjennomstrøms hastighet på 1,0 ml/min i minst 20 minutter. Den appliserte prøve var 5 µg og proteinet ble påvist

ved å overvåke UV-absorpsjonen ved 214 nm ved anvendelse av dataprogrammet "Turbochrom 2" (PE Nelson, Inc.). Kolonnen ble vedlikeholdt ved 10 % buffer B i 1 minutt etter injeksjon av prøven, etterfulgt av en lineær gradient av fra 10 % til 62 % buffer B i 20 minutter. Kolonnen ble vasket med 100 % buffer B i 5 minutter og ekvilibrert på nytt med 10 % buffer B i minst 20 minutter mellom etterfølgende prøveinjeksjoner.

Antistoffbindingsaktivitet: IgE-reseptorbindings- inhibisjonsanalyse (IE25:2) ble utført som beskrevet i Presta *et al.*, *supra*, på prøver fortynnet til 20 µg/ml og 30 µg/ml i analysefortynningsmiddel (fosfatbufret saltvann, 0,5 % BSA, 0,05 % polysorbat 20, 0,01 % Thimerosol). Hver fortynning ble deretter analysert i triplikater og resultatene ble multiplisert med en passende fortynningsfaktor for å gi en aktiv konsentrasjon. Gjennomsnittresultatet fra 6 analyser ble beregnet. Analysen måler rhuMAb-E25's evne til konkurrerende å binde IgE, og dermed hindre IgE fra å binde til dens høyaffinitetsreseptor som er festet til en ELISA-plate. Resultatene ble dividert med antistoffkonsentrasjonen som ble bestemt ved UV-absorpsjons-spektroskopi og rapportert som en spesifikk aktivitet. Tidligere eksperimenter har vist at denne analysen er indikerende for stabilitet.

Partikkelanalyse: Rekonstituerte vialer av lyofilisert rhuMAb-E25 ble samlet for å oppnå et volum på ca. 7 ml. En telling av antall partikler til stede i 1 ml prøve med størrelse varierende fra 2 til 80 µm ble bestemt ved anvendelse av en "Hiac/Royco modell 8000"-teller. Telleren ble først vasket med 1 ml prøve tre ganger, etterfulgt av målinger av 1 ml prøve i triplikater. Instrumentet bestemmer antall partikler per ml som er lik eller større enn 10 µm og antall partikler per ml som er lik eller større enn 25 µm.

Første trinnet i utviklingen av en formulering av anti-IgE-antistoffet var å bestemme en egnet buffer og pH for lyofilisering og lagring av produktet. Antistoff ved en konsentrasjon på 5,0 mg/ml ble formulert i 10 mM succinatbuffere varierende fra pH 5,0 til pH 6,5 og i natriumfosfat-, kaliumfosfat- og histidinbuffere ved pH 7,0. Figur 9 viser at det ble funnet økning i antistoffaggregat i de høyere pH-formuleringene både før og etter lyofilisering. Et unntak var histidinformuleringen ved pH 7,0, der ingen økning i aggregater ble observert ved lagring ved 2-8 °C. Figur 10 viser rhuMAb-E25 lyofilisert i 5 mM histidinbuffer både ved pH 6 og pH 7, og lagret i 1 år ved 2-8 °C, 25 °C og 40 °C. Ved hvert analysert tidspunkt og lagringstemperatur hadde pH 6-formuleringen mindre aggregat enn antistoffet formulert ved pH 7. Disse resultatene viser at histidin ved pH 6 er et spesielt nyttig buffersystem for å hindre aggregering av antistoffet.

For å lette screeningen av frysetørkingsbeskyttere ble anti-IgE-anti-stoffet formulert i natriumsuccinat ved pH 5 med eller uten en frysetørkingsbeskytter. Mulige frysetørkingsbeskyttere, tilsatt ved isotone konsentrasjoner, ble gruppert i 3 kategorier:

- (a) ikke-reduserende monosakkarider (dvs. mannitol);
- (b) reduserende disakkarider (dvs. laktose og maltose);
- og
- (c) ikke-reduserende disakkarider (dvs. trehalose og sukrose).

Aggregering av formuleringene etter lagring ved 2-8 °C og 40 °C i 1 år vises i figurene 11 og 12. Monosakkaridformuleringen (mannitol) aggregerte med en hastighet lik bufferkontrollen ved lagring ved 2-8 °C, mens formuleringene inneholdende disakkaridene var like effektive i å kontrollere aggregering (figur 11). Resultatene etter lagring ved 40 °C var like med ett unntak av sukroseformuleringen som raskt aggregerte (hvilket er sammenfallende med en brunaktig lyofilisert kake (figur 12)). Dette ble senere vist å være forårsaket av degradering av sukrose etter lagring ved både sur pH og høy temperatur.

Hydrofobinteraksjonskromatografi av antistoffet formulert i histidinbuffer ved pH 6 med laktose viste at antistoffet er forandret etter lagring i 6 måneder ved 40 °C (figur 13). Kromatografittoppene er bredere og retensjonstiden nedsatt. Disse forandringer ble ikke observert med bufferkontroll og sukroseformuleringer lagret under de samme betingelser som vist i henholdsvis figur 14 og 15. Isoelektrisk fokusering viste videre et surt skift i pI av antistoffet formulert i laktose og lagret ved 25 °C og 40 °C. Dette indikerer at reduserende sukkere ikke er egnet som fryse-tørkingsbeskyttere for antistoffet.

Aggregering av lyofiliserte formuleringer av anti-IgE ved en konsentrasjon på 20 mg/ml i 5 mM histidinbuffer ved pH 6 med varierende konsentrasjoner av sukrose og trehalose etter lagring i 12 uker ved 50 °C er vist i figur 16. Begge sukkerne har den samme beskyttende effekt på aggregering når sukkerkonsentrasjonen er større enn 500 mol sukker per mol antistoff. Disse resultater viser at isotone og hypertone formuleringer av både sukrose og trehalose ble utpekt for videre utvikling. Formuleringene er laget for påfylling før lyofilisering ved en relativt lav konsentrasjon av antistoff, og det lyofiliserte produkt rekonstitueres med mindre volum enn påfylt med bakteriostatisk vann for injeksjon (BEFI) omfattende 0,9 % benzylalkohol. Dette muliggjør konsentrering av antistoffet umiddelbart før subkutan avlevering og omfatter et konserveringsmiddel for mulig flerbruksformulering samtidig som interaksjon mellom protein og konserveringsmiddel ved langtids lagring unngås.

Isoton formulering: 25 mg/ml anti-IgE formulert i 5 mM histidinbuffer ved pH 6 med 500 mol sukker per mol antistoff, hvilket tilsvarer en sukker-konsentrasjon på 85 mM. Denne formulering rekonstitueres med BWFI (0,9 % benzylalkohol) med et volum som er fire ganger mindre enn det som var påfylt. Dette fører til en 100 mg/ml antistoff i 20 mM histidin ved pH 6 med en isoton sukker-konsentrasjon på 340 mM.

Hyperton formulering: 25 mg/ml anti-IgE formulert i 5 mM histidinbuffer

ved pH 6 med 1000 mol sukker per mol antistoff hvilket tilsvarer en sukker-konsentrasjon på 161 mM. Denne formulering rekonstitueres med BWFI (0,9 % benzyloalkohol) med et volum som er fire ganger mindre enn det påfylte. Dette medfører 100 mg/ml antistoff i 20 mM histidin ved pH 6 og en hyperton sukke-rkonsentrasjon på 644 mM.

Sammenlikninger av antistoffaggregering etter lagring av isotone og hypertone formuleringer i opp til 36 uker vises i figurene 17 til 19. Ingen endringer i aggregering ble observert verken i de hypertone eller isotone formuleringer ved lagring ved 2-8 °C (figur 17). Ved lagring under kontrollert romtemperatur (30 °C) observeres ikke økt aggregering i de hypertone formuleringer mens en økning i aggregering i fra 1 til 2 % oppstår i de isotone formuleringer (figur 18). En minimal økning i aggregering observeres med hypertone formuleringer etter lagring ved 50 °C, en 4 % økning i aggregater oppstår med den isotone trehaloseformulering og en 12 % økning i aggregering oppstår med den isotone sukroseformulering (figur 19). Disse resultater viser at den isotone formulering inneholder den minste mengde sukker nødvendig for å opprettholde stabilitet av antistoffet ved lagring ved en temperatur opp til 30 °C.

Bindingsaktiviteten av anti-IgE i isotone og hypertone formuleringer ble målt i en IgE-reseptorinhibisjonsanalyse. Det ble funnet at bindingsaktiviteten av de isotone og hypertone sukrose- og trehaloseformuleringer i hovedsak var uforandret etter lagring ved -70 °C, 2-8 °C, 30 °C og 50 °C i opp til 36 uker.

Det er kjent at lyofiliserte proteinformuleringer inneholder uløselig aggregater eller partikler (Cleland *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 10 (4):307-377 (1993)). Følgelig ble det utført en spesiell analyse av antistoff lyofilisert ved en konsentrasjon på 25 mg/ml i 5 mM histidin, pH 6 med tilsetning av 85 mM og 161 mM sukrose og trehalose. Polysorbat 20 ble tilsatt til formuleringene ved en konsentrasjon på 0,005 %, 0,01 % og 0,02 %. Prøvene ble lyofilisert og analysert etter rekonstituering til 100 mg/ml antistoff i 20 mM histidin, pH 6 med 340 mM og 644 mM sukker. Polysorbat 20 konsentrasjonen etter rekonstituering var 0,02 %, 0,04 % og 0,08 %.

Tabell 9 nedenfor viser antall partikler av størrelse lik eller større enn 10 µm, og lik eller større enn 25 µm fra de isotone og hypertone sukrose- og trehaloseformuleringer. Polysorbat 20 ble tilsatt formuleringene ved konsentrasjonene 0,005 %, 0,01 % og 0,02 % før lyofilisering. Resultatene viser at tilsetning av "Tween 20" til formuleringen betydelig reduserte antall partikler i hvert av de undersøkte størrelsesområder. US Pharmacopeia (USP)-spesifikasjon for injeksjoner av små volum er ikke flere enn 6000 partikler større enn eller lik 10 µm og ikke flere enn 600 partikler større enn eller lik 25 µm per beholder (Cleland *et al.*, *supra*). Ved tilsetning av polysorbat 20, tilfredsstilte både hypertone og isotone formuleringer denne spesifikasjon.

TABELL 9

Formulering	Polysorbat 20	Partikler per ml	
		≥ 10 µm	≥ 25 µm
Isoton sukrose	Ingen	16.122	28
	0,005 %	173	2
	0,01 %	224	5
	0,02 %	303	6
Hyperton sukrose	Ingen	14220	84
	0,005 %	73	6
	0,01 %	51	0
	0,02 %		6
Isoton trehalose	Ingen	33.407	24
	0,005 %	569	4
	0,01 %	991	16
	0,02 %	605	9
Hyperton trehalose	Ingen	24.967	28
	0,005 %	310	11
	0,01 %	209	6
	0,02 %	344	6

En formulering utviklet for anti-IgE-antistoff (dvs. 143 mg ampulle isoton formulering av rhuMAb-E25) som er antatt å være nyttig for subkutan avlevering av dette antistoff vises i tabell 10 nedenfor. En 10 ml ampulle er fylt med 5,7 ml rhuMAb-E25 ved en konsentrasjon på 25 mg/ml formulert i 5 mM histidin ved pH 6,0 med 0,01 % polysorbat 20. Sukrose tilsettes som en frysetørkingsbeskytter ved en konsentrasjon på 85 mM, hvilket tilsvarer et molforhold av sukker til antistoff på 500 til 1. Vialen frysetørkes og rekonstitueres med 0,9 % benzylalkohol til en 1/4 av det påfylte volum eller 1,2 ml. Sluttkonsentrasjonen av bestanddelene i formuleringen øker fire ganger til 100 mg/ml rhuMAb-E25 i 20 mM histidin ved pH 6 med 0,04 % polysorbat 20 og 340 mM sukrose (isoton) og 0,9 % benzylalkohol. Formuleringen inneholder histidinbuffer ved pH 6 på grunn av dens påviste beskyttende effekt på antistoffaggregering. Sukrose ble tilsatt som frysetørkings-beskytter på grunn av sin tidligere anvendelse i den farmasøytiske industri. Konsentrasjonen av sukker ble valgt for å gi en isoton

formulering ved rekonstituering. Sluttelig tilsettes polysorbat 20 for å forhindre dannelsen av uløselige aggregater.

TABELL 10

Prelyofilisert formulering (5,7 ml påfylt 10 ml vial)	Rekonstituert formulering (1,2 ml 0,9 % benzylalkohol)
25 mg/ml rhuMAb-E25	100 mg/ml rhuMAb-E25
5 mM histidin, pH 6,0	20 mM histidin pH 6,0
85 mM sukrose	340 mM sukrose
0,01 % polysorbat 20	0,04 % polysorbat 20
-	0,9 % benzylalkohol

P a t e n t k r a v

1. Stabil rekonstituert formulering,
karakterisert ved at den omfatter et antistoff i en mengde på 50 mg/ml til 400 mg/ml og et fortynningsmiddel, der den rekonstituerte formuleringen har blitt fremstilt fra en lyofilisert blanding av et antistoff og en frysetørkingsbeskytter, der det molare forholdet frysetørkingsbeskytter:antistoff i blandingen er omtrent 100-600 mol frysetørkingsbeskytter:1 mol antistoff, og der antistoffkonsentrasjonen i den rekonstituerte formuleringen er omtrent 2-40 ganger høyere enn antistoff-konsentrasjonen i blandingen før lyofilisering.
2. Stabil rekonstituert formulering ifølge krav 1, hvor frysetørkingsbeskytteren er sukrose eller trehalose.
3. Stabil rekonstituert formulering ifølge krav 1 eller 2, hvor den ytterligere omfatter en buffer.
4. Stabil rekonstituert formulering ifølge krav 3, hvor bufferen er histidin eller succinat.
5. Stabil rekonstituert formulering ifølge ethvert av kravene 1-4, hvor den ytterligere omfatter en surfaktant.
6. Stabil rekonstituert formulering ifølge ethvert av de foregående krav, hvor antistoffet er et anti-IgE-antistoff.
7. Stabil rekonstituert formulering ifølge ethvert av kravene 1-5, hvor antistoffet er et anti-HER2-antistoff.
8. Stabil rekonstituert formulering ifølge ethvert av de foregående krav, hvor den er isoton.
9. Stabil rekonstituert formulering ifølge krav 1, hvor antistoffet i formuleringen er et monoklonalt antistoff.
10. Stabil rekonstituert formulering ifølge krav 1, hvor den rekonstituerte formuleringen ikke oppviser signifikante eller uakseptable nivåer av kjemisk eller fysisk ustabilitet for antistoffet ved lagring ved 2-8 °C i minst 30 dager.

11. Stabil rekonstituert formulering ifølge krav 1, hvor mindre enn 10 % av antistoffet foreligger som et aggregat i den rekonstituerte formuleringen.
12. Stabil rekonstituert formulering ifølge krav 1, hvor mindre enn 5 % av antistoffet foreligger som et aggregat i den rekonstituerte formuleringen.
13. Stabil rekonstituert formulering ifølge krav 1, hvor frysetørkingsbeskytteren er et ikke-reduserende sukker.
14. Stabil rekonstituert formulering ifølge krav 1, hvor frysetørkingsbeskytteren er et disakkarid.
15. Stabil rekonstituert formulering ifølge krav 14, hvor frysetørkingsbeskytteren er et ikke-reduserende disakkarid.
16. Stabil rekonstituert formulering ifølge krav 1, hvor det molare forholdet frysetørkingsbeskytter:antistoff er omtrent 200-600 mol frysetørkingsbeskytter:1 mol antistoff.
17. Lyofilisert formulering,
karakterisert ved at den omfatter en lyofilisert blanding av en frysetørkings-beskytter og et monoklonalt antistoff, en buffer og en surfaktant, der antistoffet er huMab4D5-8, frysetørkingsbeskytteren er trehalose eller sukrose og det molare forholdet frysetørkingsbeskytter:antistoff er omtrent 200-600 mol frysetørkings-beskytter:1 mol antistoff.
18. Lyofilisert formulering ifølge krav 17, hvor surfaktanten er polysorbat 20.
19. Lyofilisert formulering ifølge krav 17 eller 18, hvor bufferen er histidin eller natriumsuccinat.
20. Lyofilisert formulering ifølge krav 17 eller 18, hvor bufferen er histidin.
21. Lyofilisert formulering ifølge ethvert av kravene 17 til 20, hvor frysetørkingsbeskytteren er trehalose.
22. Lyofilisert formulering ifølge krav 21, hvor det molare forholdet frysetørkingsbeskytter:antistoff er omtrent 360 mol frysetørkingsbeskytter:1 mol antistoff.

23. Lyofilisert formulering ifølge krav 22, hvor mindre enn omtrent 10 % av antistoffet foreligger som et aggregat i formuleringen.
24. Lyofilisert formulering ifølge krav 22, hvor økning i aggregert antistoff i den lyofiliserte formuleringen er mindre enn omtrent 5 % når den lyofiliserte formuleringen blir lagret ved 2-8 °C i minst ett år.
25. Lyofilisert formulering ifølge krav 22, hvor den er steril.
26. Rekonstituert formulering,
karakterisert ved at den omfatter formuleringen ifølge et hvilket som helst av kravene 17-25 rekonstituert i et fortynningsmiddel, der konsentrasjonen av humanisert antistoff i den rekonstituerte formuleringen ligger innenfor området 50 mg/ml til 400 mg/ml.
27. Rekonstituert formulering ifølge krav 26, hvor konsentrasjonen av antistoff i den rekonstituerte formuleringen ligger innenfor området fra 80 mg/ml til 300 mg/ml.
28. Rekonstituert formulering ifølge krav 26, hvor fortynningsmidlet er sterilt vann eller bakteriostatisk vann til injeksjon(BWFI).
29. Rekonstituert formulering ifølge krav 26, hvor den er til subkutan eller intramuskulær administrering.
30. Rekonstituert formulering ifølge krav 26, hvor den er isoton.
31. Fremgangsmåte for fremstilling av en stabil, isoton, rekonstituert formulering,
karakterisert ved at den omfatter å rekonstituere en lyofilisert blanding av et antistoff og en frysetørkingsbeskytter, der det molare forholdet mellom frysetørkingsbeskytter: antistoff i blandingen er omtrent 100-600 mol frysetørkingsbeskytter:1 mol antistoff i et fortynningsmiddel slik at konsentrasjonen av antistoff i de rekonstituerte formuleringene er 50 mg/ml til 400 mg/ml, der konsentrasjonen av antistoff i den rekonstituerte formuleringen er 2-40 ganger høyere enn konsentrasjonen av antistoff i blandingen før lyofilisering.
32. Fremgangsmåte ifølge krav 31, hvor den omfatter trinnene med å
 - a) lyofilisere en blanding av antistoffet og frysetørkingsbeskytteren, der det molare forholdet frysetørkingsbeskytter:antistoff i blandingen er på omtrent 100-600 mol frysetørkingsbeskytter:1 mol antistoff, og

- b) rekonstituere den lyofiliserte blandingen i trinn (a) i et fortynningsmiddel slik at den rekonstituerte formuleringen er isoton og stabil og har en antistoffkonsentrasjon på 50 mg/ml til 400 mg/ml.
33. Fremgangsmåte ifølge krav 32, hvor konsentrasjonen av antistoff i den rekonstituerte formuleringen er fra 80 mg/ml til 300 mg/ml.
34. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 31-33, hvor lyofiliseringen blir utført ved en hylletemperatur som er opprettholdt på omtrent 15-30 °C i løpet av hele lyofiliserings-prosessen.
35. Fremstilt artikkel,
karakterisert ved at den omfatter:
- a) en beholder som inneholder en lyofilisert blanding av et antistoff og en frysetørkingsbeskytter, der det molare forholdet frysetørkingsbeskytter: antistoff i blandingen er på omtrent 100-600 mol frysetørkingsbeskytter:1 mol antistoff og
- b) instruksjoner for å rekonstituere den lyofiliserte blandingen med et fortynningsmiddel for å få en antistoffkonsentrasjon i den rekonstituerte formuleringen på 50 mg/ml til 400 mg/ml.
36. Fremstilt artikkel ifølge krav 35, hvor den ytterligere omfatter en andre beholder som inneholder et fortynningsmiddel.
37. Fremstilt artikkel ifølge krav 36, hvor fortynningsmidlet er bakteriostatisk vann til injeksjon som omfatter en aromatisk alkohol, vann eller steril fysiologisk saltløsning.
38. Fremstilt artikkel ifølge krav 35, hvor den omfatter:
- a) en beholder som inneholder formuleringen ifølge krav 25 og
- b) instruksjoner for å rekonstituere den lyofiliserte formuleringen med et fortynningsmiddel for å få en konsentrasjon av humanisert antistoff i den rekonstituerte formuleringen som ligger innenfor området fra 80 mg/ml til 300 mg/ml.
39. Fremstilt artikkel ifølge krav 38, hvor den ytterligere omfatter en andre beholder som inneholder fortynningsmidlet, der fortynningsmidlet er sterilt vann eller bakteriostatisk vann til injeksjon (BWFI).

40. Anvendelse av formulering ifølge krav 1 for fremstilling av et medikament til behandling av et pattedyr som har en forstyrrelse som krever behandling med proteinet i formuleringen.
41. Anvendelse ifølge krav 40, der formuleringen er til subkutan administrering.
42. Anvendelse ifølge krav 40, der medikamentet er til behandling av kreft som er karakterisert ved overuttrykking av HER2-reseptoren, og der antistoffet i formuleringen binder HER2-reseptoren.
43. Anvendelse ifølge krav 42, der formuleringen blir administrert subkutan.
44. Anvendelse ifølge krav 42, der kreften er valgt fra gruppen som består av brystkreft, ovariekreft, magekreft, endometriekreft, spyttkjertelkreft, lungekreft, nyrekreft, colonkreft og blærekreft.
45. Anvendelse ifølge krav 42, der medikamentet er til behandling av duktalt karsinom *in situ*.

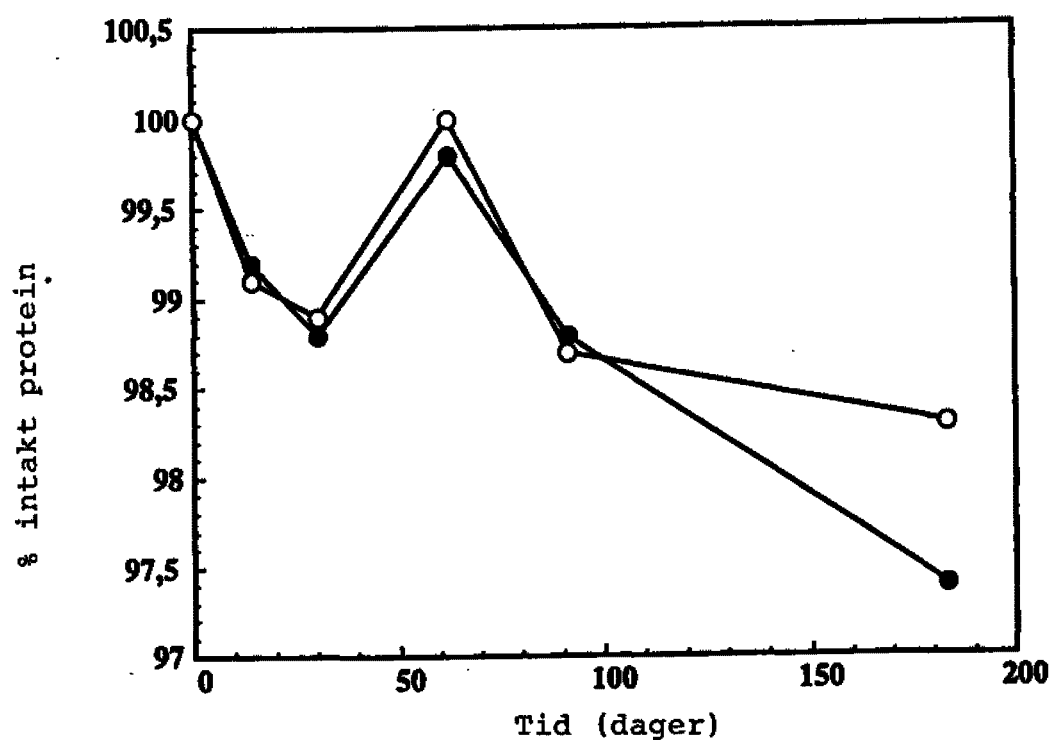


FIG. 1

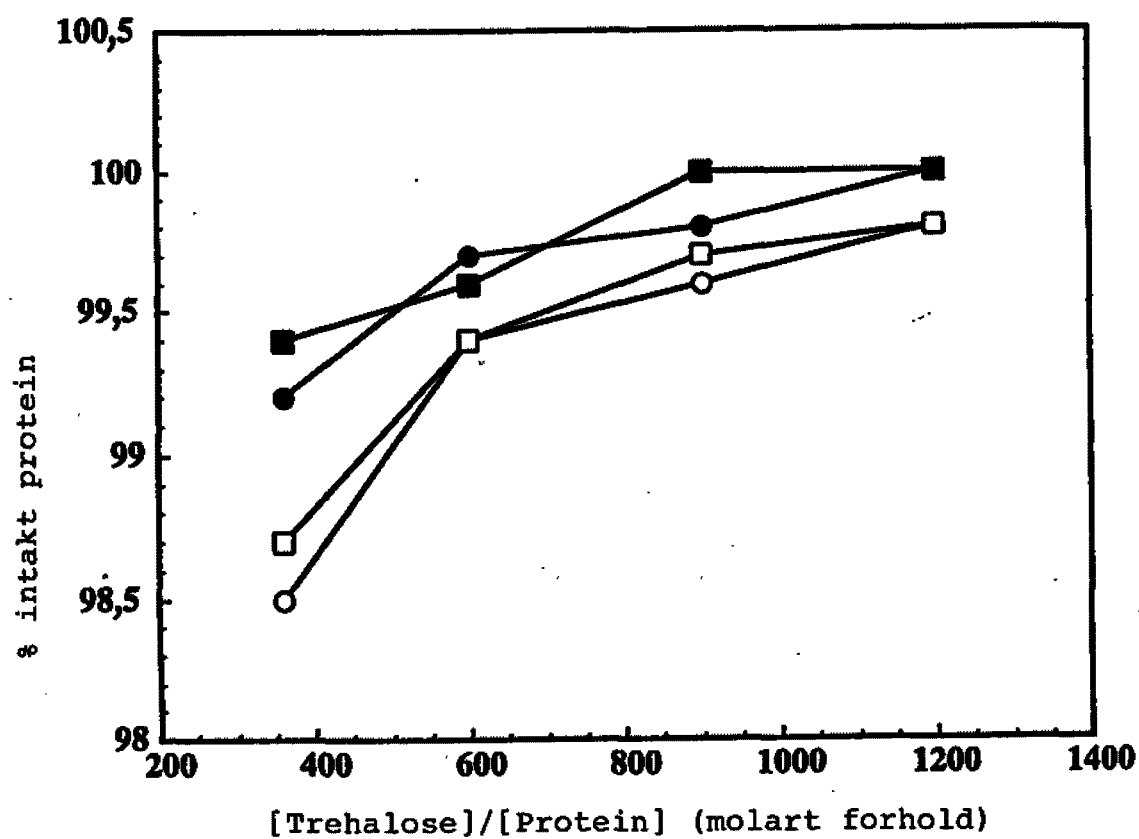


FIG. 2

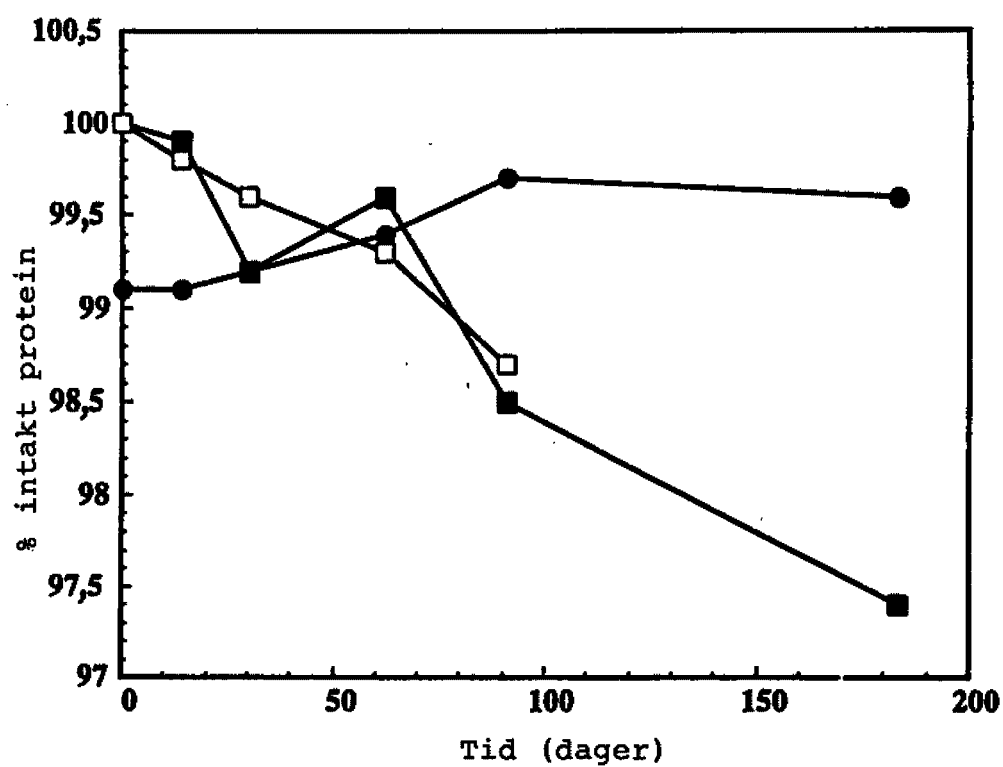


FIG. 3

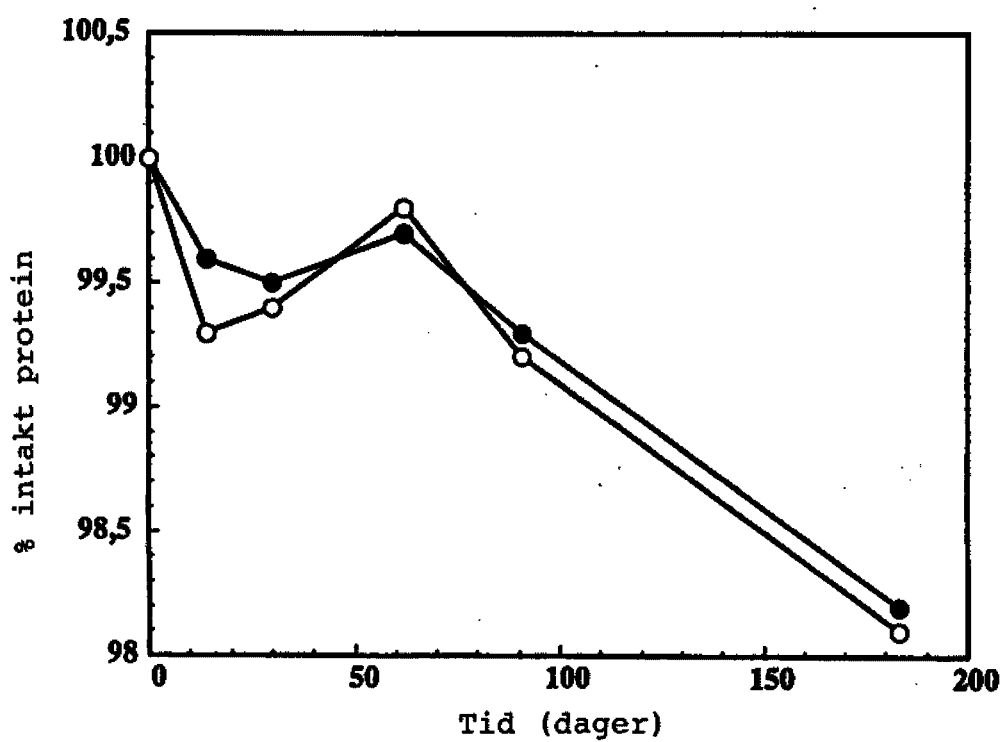


FIG. 4

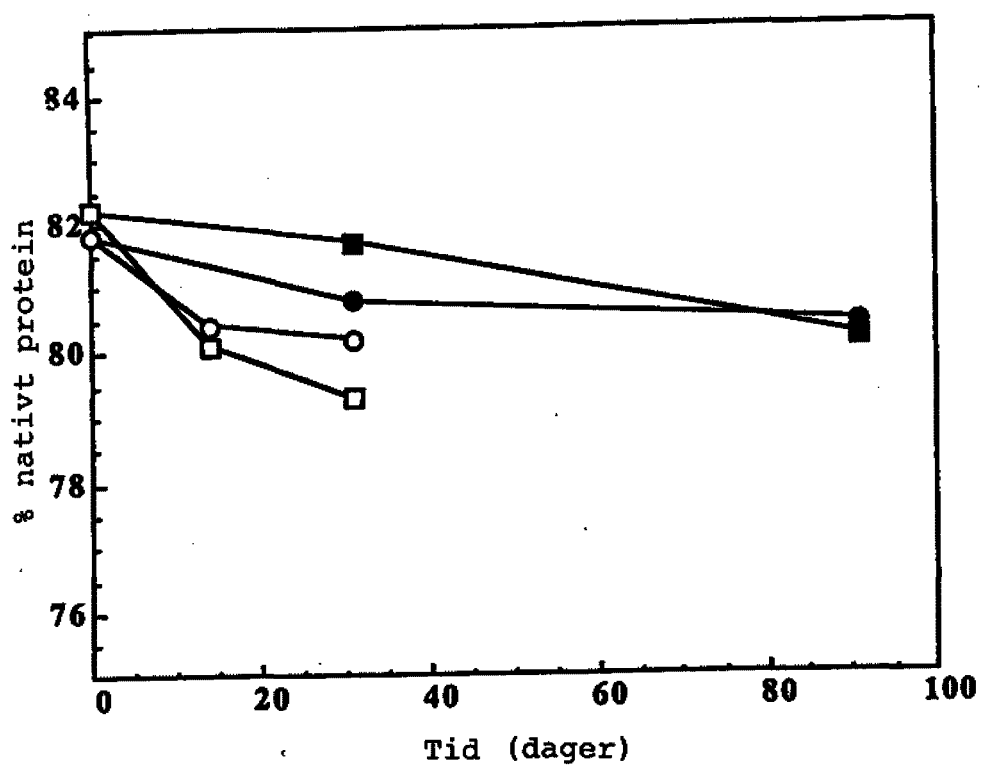


FIG. 5

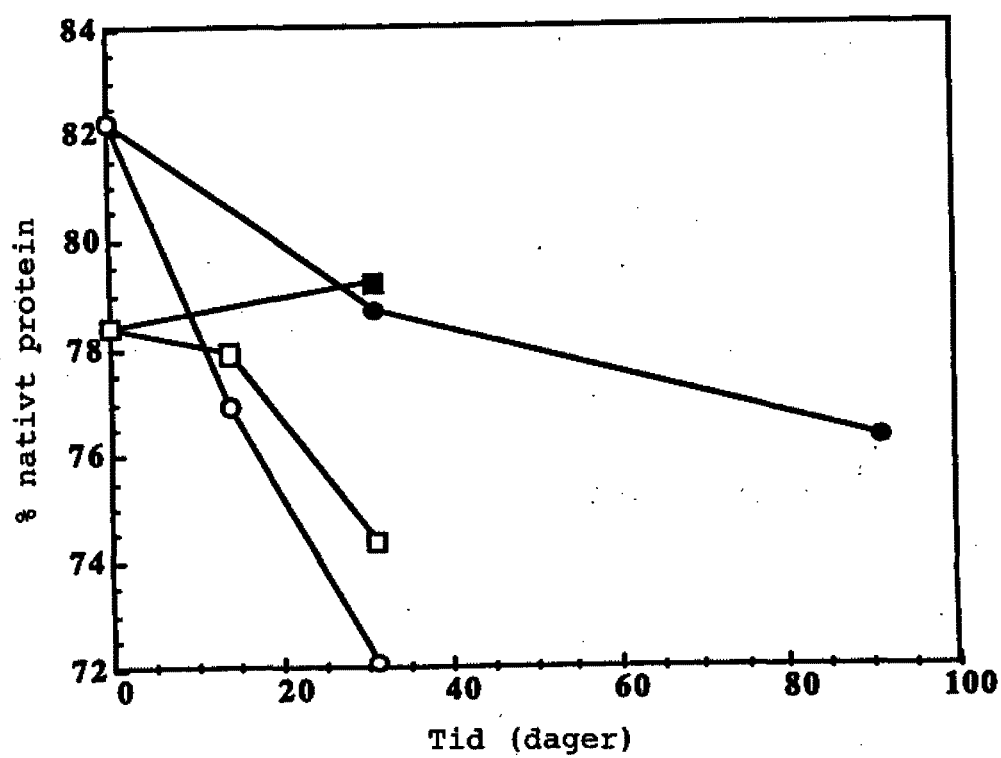


FIG. 6

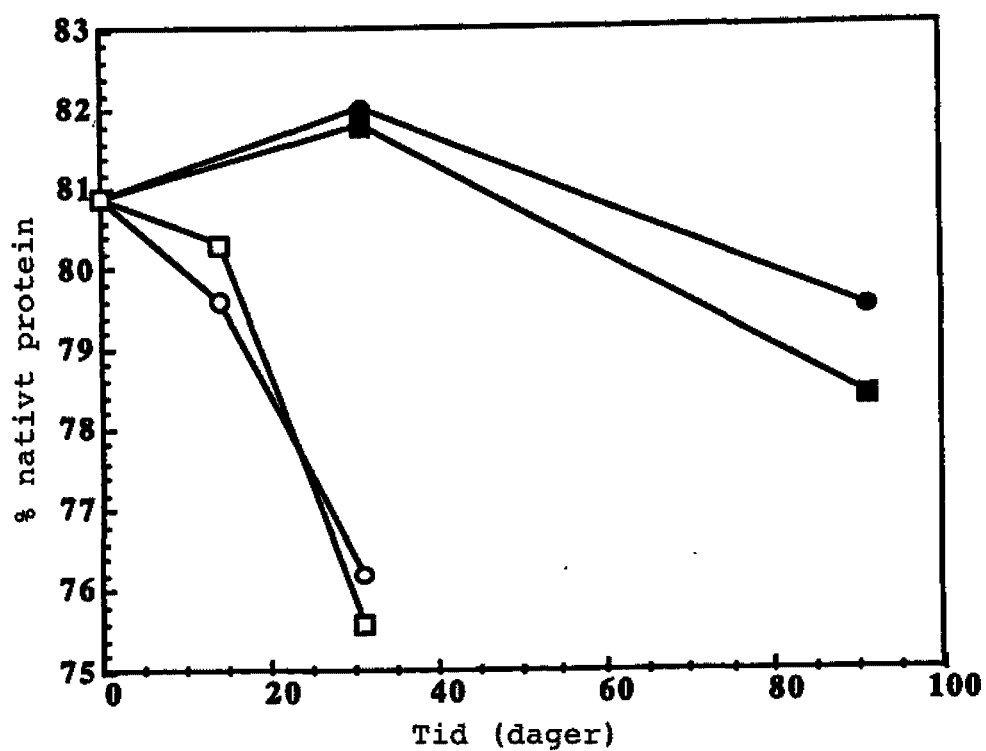


FIG. 7

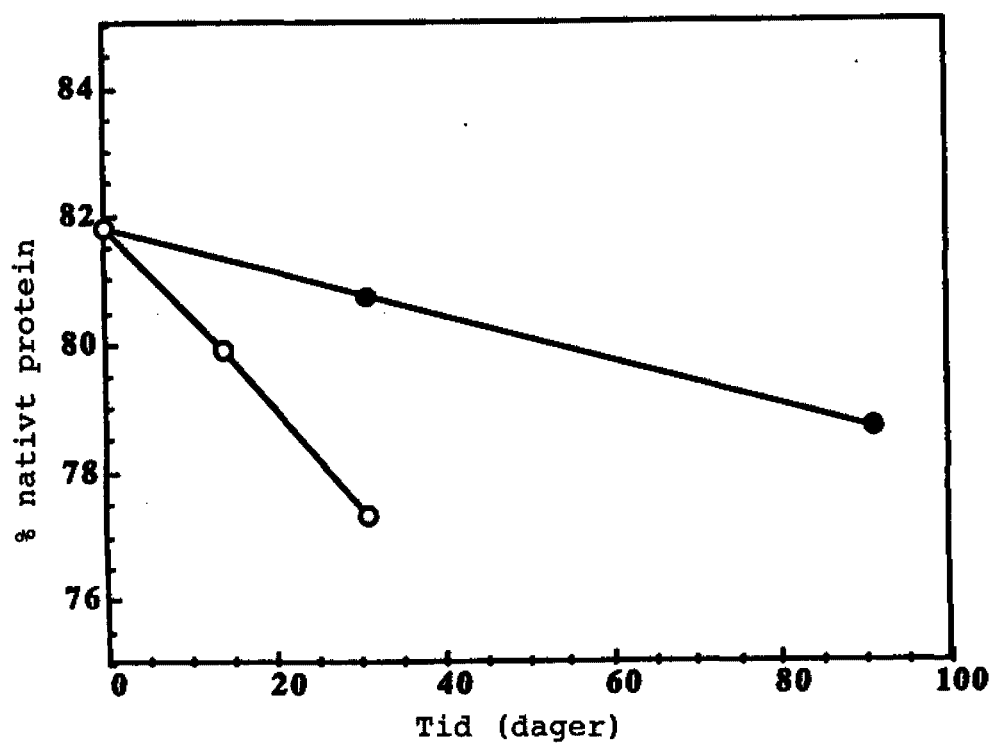


FIG. 8

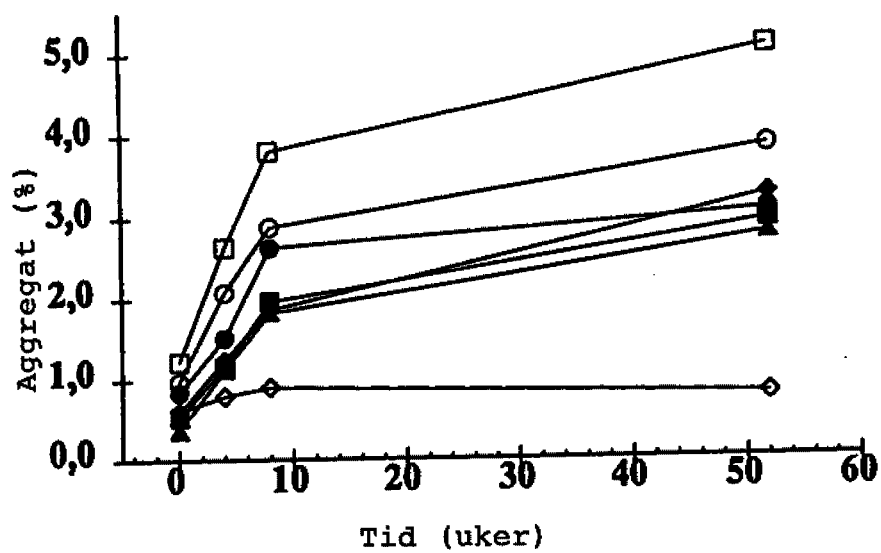


FIG. 9

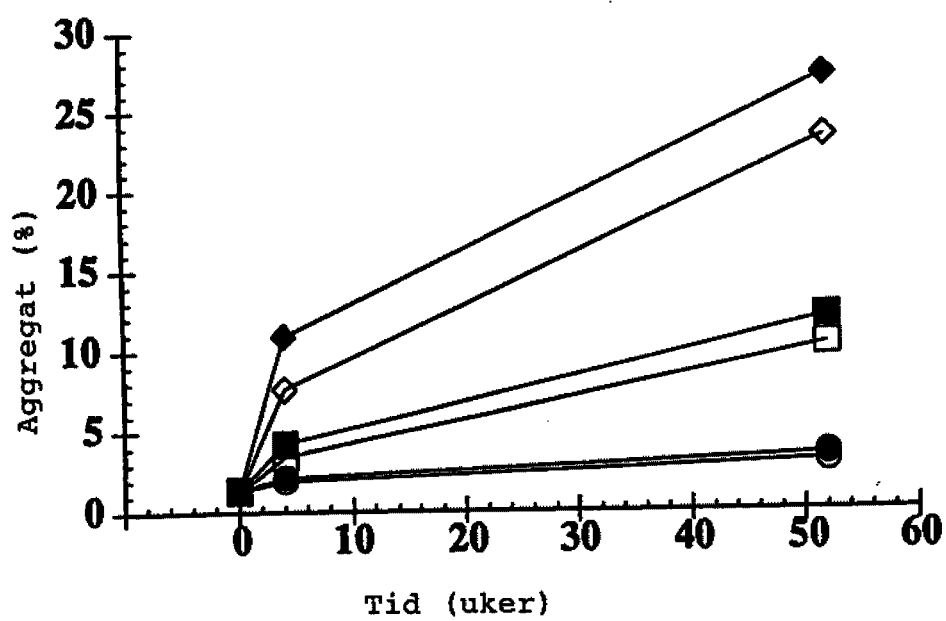


FIG. 10

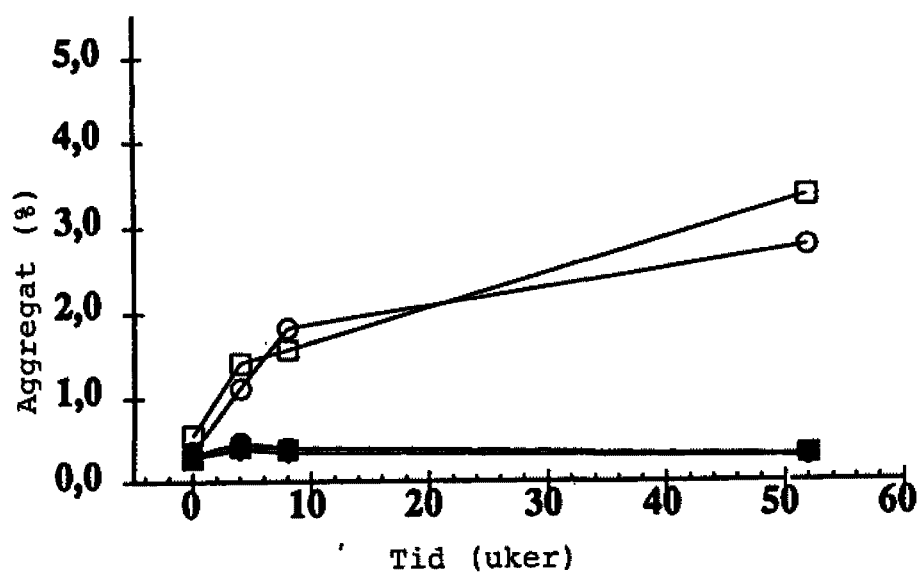


FIG. 11

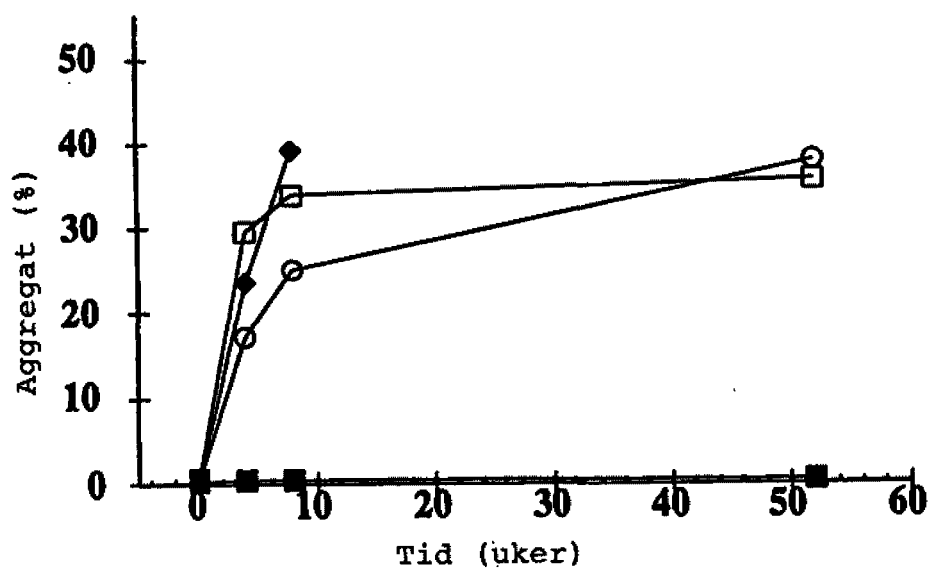
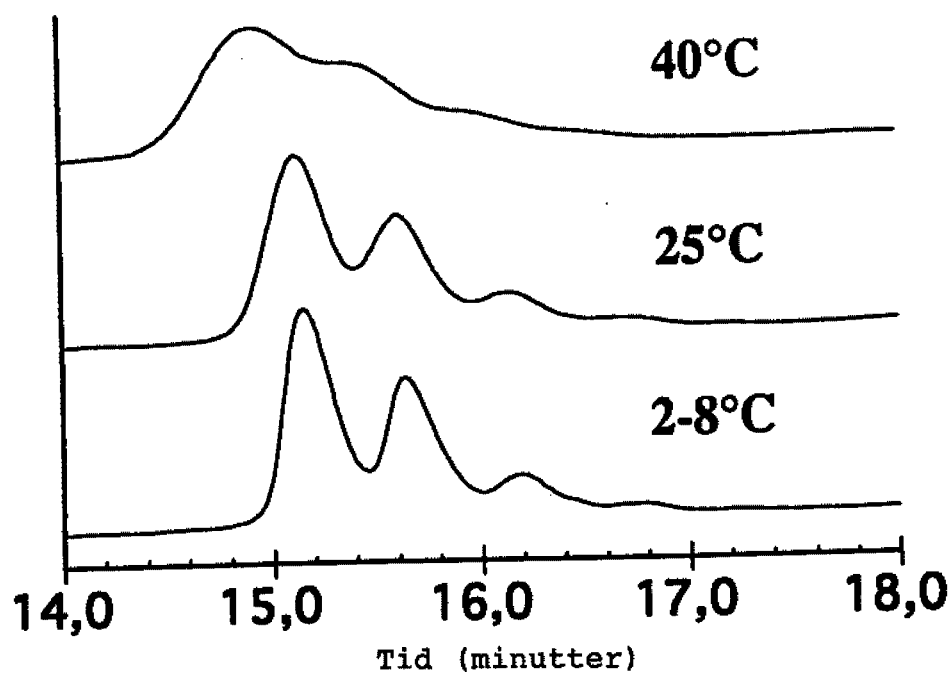
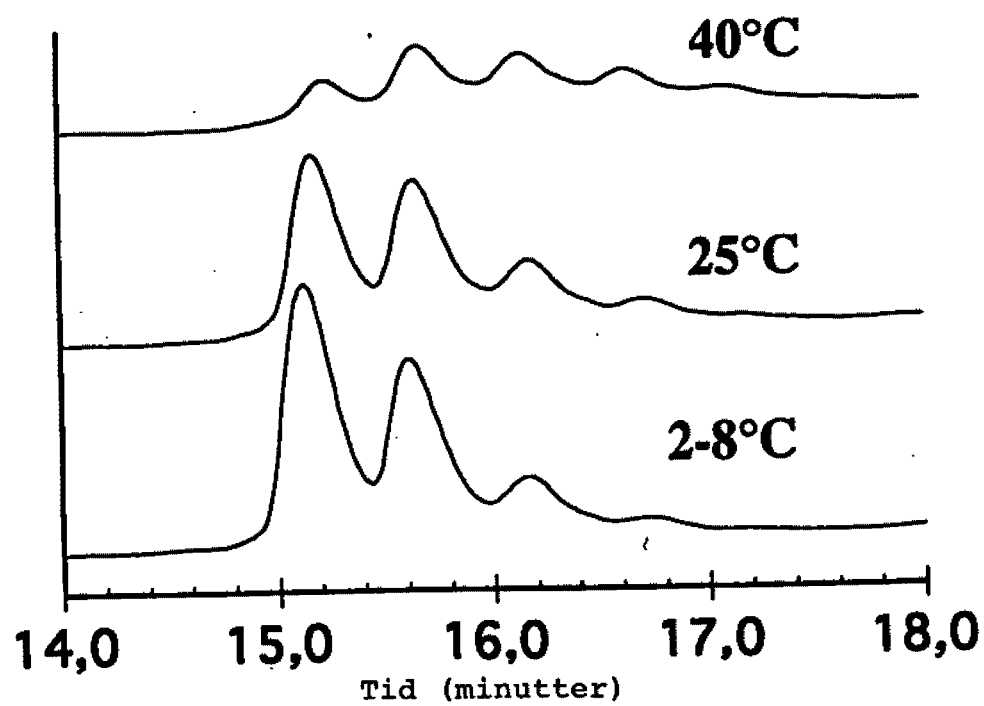


FIG. 12

**FIG. 13****FIG. 14**

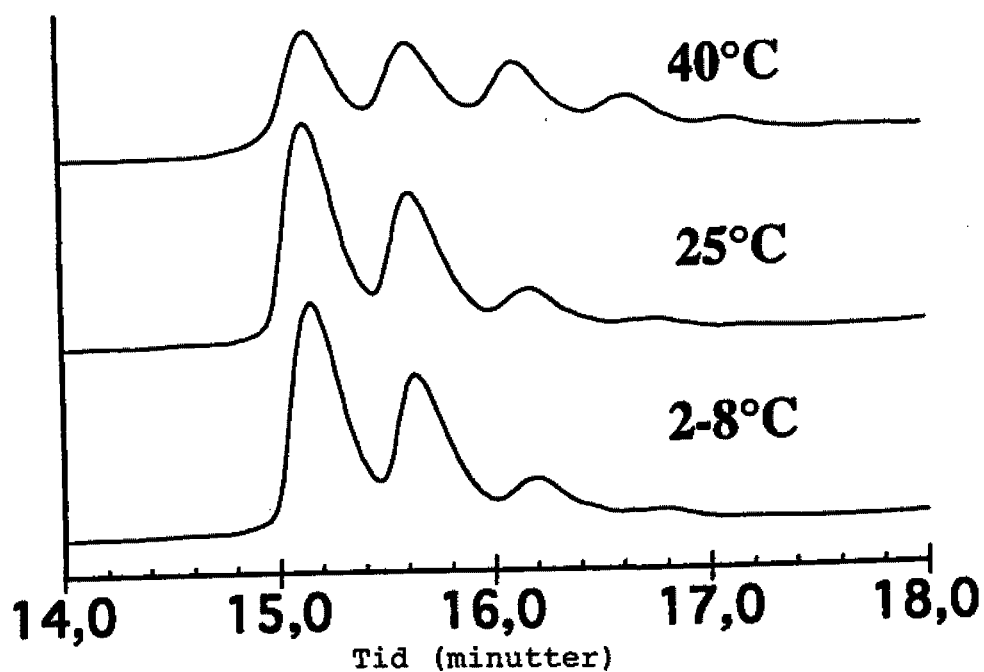


FIG. 15

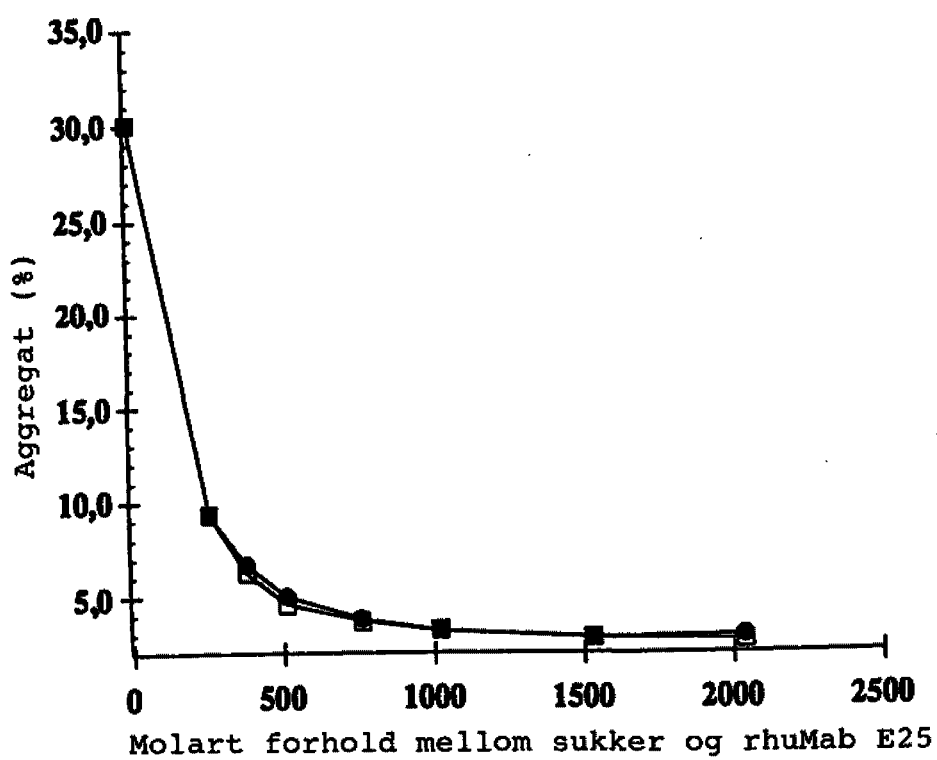


FIG. 16

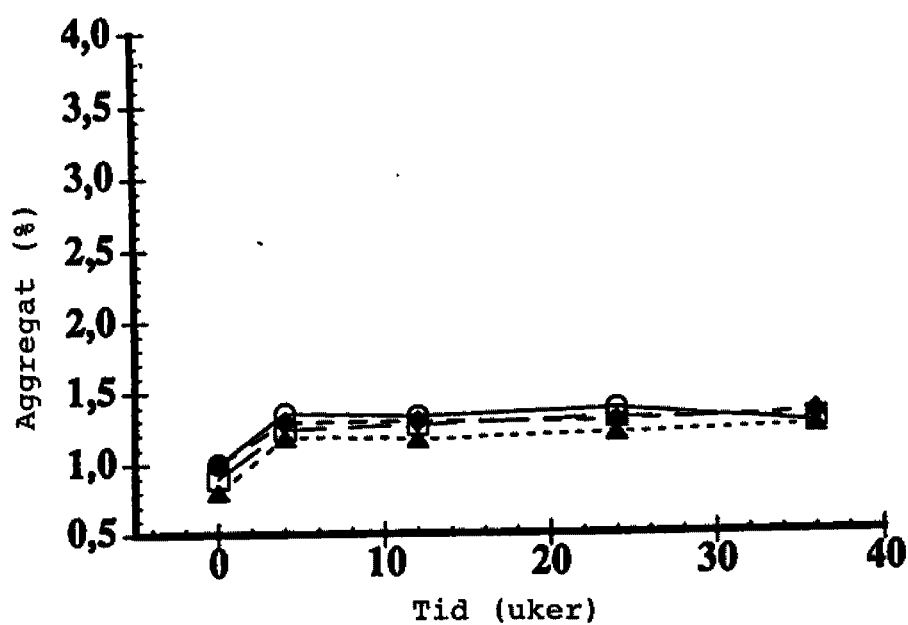


FIG. 17

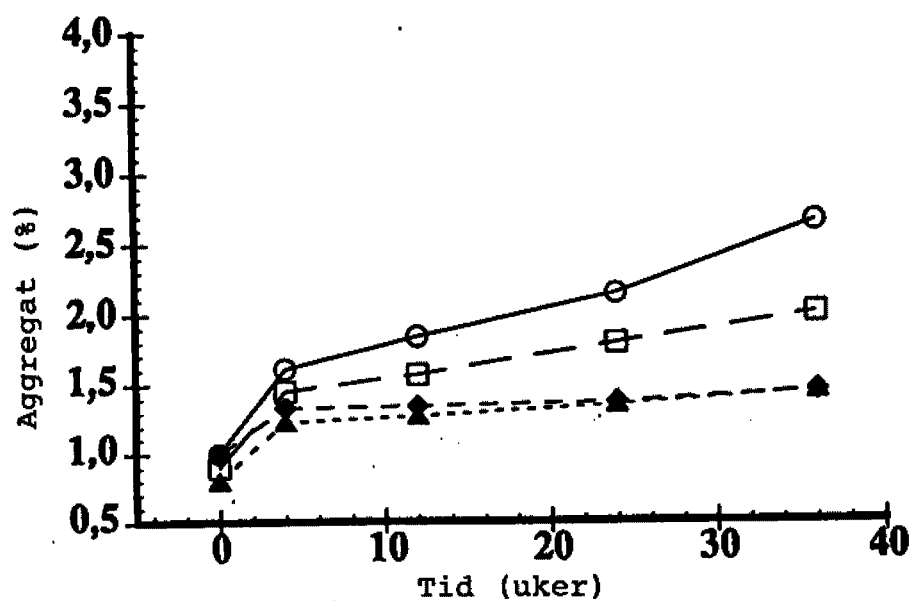
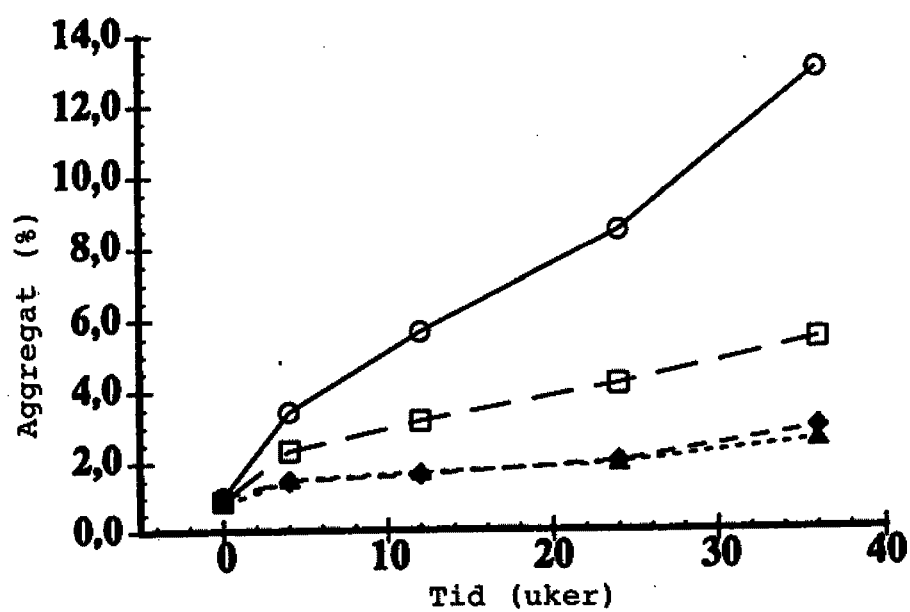


FIG. 18

**FIG. 19**