



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 986 900**

⑯ Int. Cl.:

**A61K 9/48** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2017** PCT/US2017/049211

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2018** WO18044948

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2017** E 17765519 (8)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024** EP 3504241

⑮ Título: **Formulaciones de anticuerpos anti-cd3**

⑯ Prioridad:

**29.08.2016 US 201662380652 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.11.2024**

⑯ Titular/es:

**TIZIANA LIFE SCIENCES PLC (100.0%)**  
9th Floor, 107 Cheapside  
London EC2V 6DN, GB

⑯ Inventor/es:

**SHAILUBHAI, KUNWAR**

⑯ Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 986 900 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Formulaciones de anticuerpos anti-CD3

**5 SOLICITUDES RELACIONADAS**

Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad del documento U.S.S.N. 62/380.652 presentado el 29 de agosto de 2016.

**10 CAMPO DE LA INVENCIÓN**

Esta invención se refiere a formulaciones, dosis, y regímenes de dosificación de anticuerpos anti-CD3, así como a métodos para su uso.

**15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

Los anticuerpos contra la molécula de señalización CD3 épsilon del complejo receptor de células T han demostrado ser útiles como inmunosupresores y en el tratamiento de trastornos autoinmunes. Por tanto, serían útiles métodos mejorados para preparar anticuerpos anti-CD3, métodos para purificar anticuerpos anti-CD3 y formulaciones farmacéuticas que contengan anticuerpos anti-CD3.

El documento WO2007/033230 describe la formulación de un anticuerpo anti-CD3. Los documentos WO2011/080209 y WO2007/113648 describen formulaciones para anticuerpos anti-EGFR o anti-CTLA4, respectivamente. El documento WO2010/148337 describe formulaciones para la liofilización de una proteína farmacéutica. Los excipientes para formulaciones biológicas se describen en Medi MB et al, European Pharmaceutical Re, 2014, 1(1), 16-20 y J Kang et al "Rapid Formulation Development for Monoclonal Antibodies - BioProcess InternationalBioProcess International", 12 de abril de 2016, URL: <http://www.bioprocessintl.com/manufacturing/formulation/rapid-formulation-development-for-monoclonal-antibodies/>.

**30 SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

La presente descripción proporciona formulación, dosis, y regímenes de dosificación para anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra CD3. Las formulaciones de la presente descripción incluyen un anticuerpo anti-CD3, y estas formulaciones se denominan aquí "formulaciones de anticuerpo anti-CD3". En algunas realizaciones, la formulación de anticuerpo anti-CD3 es una formulación oral.

En diversos aspectos, la invención proporciona una formulación oral que comprende: anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, acetato de sodio trihidrato, cloruro de sodio, polisorbato 80, trehalosa, y metionina; en la que el anticuerpo anti-CD3 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y

la formulación es un líquido, y en la que la concentración de:

- 45 a. el acetato de sodio trihidrato es 10 mM a 500 mM;
- b. el cloruro de sodio es 10 mM a 500 mM;
- c. el polisorbato 80 es 0,01 % a 1 % (p/v);
- d. la trehalosa es 5 % a 25 % (p/v); y
- e. la metionina es 0,1 % a 0,5 % (p/v).

55 En un segundo aspecto, la invención proporciona una formulación oral que comprende: anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, acetato de sodio trihidrato, cloruro de sodio, polisorbato 80, trehalosa, y metionina; en la que el anticuerpo anti-CD3 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en la que la formulación es un polvo liofilizado, y en la que la relación de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno a:

- 60 a. polisorbato 80 es 1: 0,01 a 0,1 (p/p);
- b. trehalosa es 1: 10 a 50 (p/p);

- c. metionina es 1: 0,1 a 0,5 (p/p);
- d. acetato de sodio trihidrato es 1:0,1 a 1,0 (p/p); y
- 5 e. cloruro de sodio es 1:0,5 a 2,0 (p/p).

En otro aspecto, la invención proporciona una formulación oral en polvo que comprende una dosis unitaria de 0,1 mg a 10 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo y 0,58 mg de acetato de sodio trihidrato, 1,25 mg de cloruro de sodio, 0,034 mg de polisorbato 80, 34. mg de trehalosa y 0,17 mg de metionina por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende además opcionalmente 0,17 mg de EDTA por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, en la que el anticuerpo anti-CD3 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

15 En otro aspecto, la invención proporciona una cápsula oral con recubrimiento entérico como se describió anteriormente aquí, para uso en un método para tratar o aliviar un síntoma de una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio, una enfermedad neurodegenerativa, o cáncer, que comprende administrar la cápsula oral con recubrimiento entérico a un sujeto que lo necesita, opcionalmente en el que la enfermedad autoinmune es esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis biliar primaria (CBP), diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, o colitis ulcerosa (UC).

20 Otros aspectos de la invención se describen en las reivindicaciones dependientes.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra el efecto del tiempo y la temperatura en las formulaciones de NI-0401: SEC-HPLC: Área total (AUC).

30 La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra el efecto del tiempo y la temperatura en las formulaciones de NI-0401: SEC-HPLC: % de impureza.

35 La Figura 3 son fotografías de geles SDS que muestran el efecto del tiempo y la temperatura sobre la estabilidad de formulaciones de NI-0401 liofilizadas dializadas Iteración#2: SDS PAGE no reductora: T0 y T14

40 La Figura 4 es un gráfico que muestra la comparación de la temperatura de transición vítrea (tg) de la formulación principal sin dializar (10 % de trehalosa), 10 % de trehalosa 0,1 % de metionina frente a 20 % de trehalosa +/- EDTA; Superposición de cambio de flujo de calor inverso.

45 La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra el efecto del tiempo y la temperatura sobre las formulaciones de NI-0401 principales liofilizadas: SEC-HPLC: % de pico principal: T14 se mantuvo a 50 °C y 4 °C a 50 °C.

50 La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra el efecto del tiempo y la temperatura en formulaciones liofilizadas principales de NI-0401: SEC-HPLC: AUC de pico total: T14 se mantuvo a 50 °C y 4 °C.

55 La Figura 7 es un gráfico de barras que muestra el efecto del tiempo y la temperatura sobre las formulaciones liofilizadas de NI-0401: SEC-HPLC: % de impureza total: T14 se mantuvo a 50 °C y 4 °C.

60 La Figura 8 es un gráfico de barras que muestra el efecto del tiempo y la temperatura sobre las formulaciones liofilizadas de NI-0401: SEC-HPLC: % de recuperación de pico total en T14 frente a T0.

65 La Figura 9 es un gráfico de barras que muestra el efecto del tiempo y la temperatura sobre las formulaciones liofilizadas de NI-0401: SEC-HPLC: % de recuperación pico principal en T14 frente a T0.

70 La Figura 10 es una fotografía de un gel de SDS que muestra el efecto del tiempo y la temperatura sobre la estabilidad de formulaciones liofilizadas principales en T0 y T14: SDS-PAGE no reductora.

75 La Figura 11 es una fotografía de un gel de SDS que muestra el efecto del tiempo y la temperatura sobre la estabilidad de formulaciones liofilizadas principales en T0 y T14: SDS-PAGE reductora.

80 La Figura 12 es una fotografía de un gel de IEF que muestra el efecto del tiempo y la temperatura sobre la estabilidad de formulaciones liofilizadas principales en T0 y T14: gel de IEF \*Los carriles 1,4,8 y 10 son marcadores de pl con 5, 10, 15 y 20  $\mu$ l de carga.

85 La Figura 13 es un gráfico que muestra el perfil de cIEF típico de la formulación de NI-0401 actual en T0-Lio y análisis.

5

La Figura 14 es un gráfico que muestra el análisis de enfoque isoeléctrico capilar (cIEF) de NI-0401 después de la liofilización. cIEF se realizó usando un voltaje de 30 KV durante 15 minutos en la Etapa 1, y un voltaje de 30 KV durante 30 minutos en la Etapa 2. El valor de pI de NI-0401 es -9,25 (básico).

10

La Figura 15 es un gráfico de barras que muestra la distribución de la población heterogénea de NI-0401 en la formulación principal frente a la formulación actual en T0 y T14.

15

La Figura 16 es una fotografía que muestra la estabilidad y pureza del foralumab según se determina mediante análisis de SEC-HPLC correlacionado con el aspecto e integridad de la torta. Las formulaciones con arginina y ascorbato mostraron la mayor cantidad de colapso y pérdida de material.

20

La Figura 17 es una fotografía que muestra el aspecto de la torta de formulaciones principales liofilizadas en T14 (14 días después de la liofilización) a 40°C o 50°C. (1) Formulación de control, amortiguador sólo, (2) 20 % de trehalosa + 0,1 % de metionina y (3) 20 % de trehalosa + 0,1 % de metionina + 0,1 % de EDTA. NI-0401 mostró una torta intacta en las formulaciones que contienen trehalosa y metionina. Se observa más colapso en la formulación de control.

25

La Figura 18 es un gráfico que muestra la determinación por MDSC (calorimetría diferencial de barrido modulado) de las temperaturas de congelación, de fusión y de transición vítreo.

30

Figura 19 A y B: Análisis de SDS-PAGE de NI-0401 en formulaciones liofilizadas en condiciones no reducidas (A) y reducidas (B). No se observaron cambios en la pureza del anticuerpo NI-0401 después del ciclo de liofilización a temperatura ambiente (T0) o después del almacenamiento durante 14 días (T14) a 4 °C o 50 °C. La pureza del anticuerpo fue superior al 98 %, pero en el amortiguador de control en T14 y 50 °C, la pureza cayó al 85 % en condiciones no reductoras.

35

La Figura 20 es un gráfico de líneas que muestra el análisis de concentraciones lineales de foralumab mediante SEC-HPLC para determinar la pureza del anticuerpo.

40

La Figura 21 A-C es una serie de gráficos que muestran el análisis de SEC-HPLC de las formulaciones de foralumab liofilizadas en T0 (A), T14 a 4 °C (B) y T14 a 40 °C (C). Las formulaciones principales mostraron una excelente estabilidad sin impurezas en comparación con la formulación de control.

45

La Figura 22 A-C son gráficos que muestran un cromatograma de SEC-HPLC representativo a una inyección de 36,78 µg o 6 µl usada para detectar impurezas. Escala completa (A). Escala ampliada (B). Superposición (C)

50

Las Figuras 23 A y B son cromatografías que muestran que el material liofilizado es estable a 50 °C durante 14 días. Escala completa (A). Agrandada (B).

55

La Figura 24 A-D es una serie de cromatografías que muestran la pureza de las formulaciones principales de foralumab después de la liofilización. Ambas formulaciones principales mostraron una pureza >98 % (SEC-HPLC) después de la liofilización.

60

La Figura 25 es una cromatografía que muestra SEC-HPLC del foralumab no formulado que muestra una mayor degradación del pico principal en impurezas observada en las formulaciones de control y de manitol.

65

La Figura 26 es un gráfico que muestra la temperatura de transición vítreo de la formulación principal en comparación con la formulación de control (amortiguador). La temperatura de transición vítreo de -30-37 °C impidió el colapso de la torta liofilizada. Análisis de MDSC (calorimetría diferencial de barrido modulado) de formulaciones principales de NI-0401 después del procedimiento de liofilización. Análisis de MDSC a diferentes temperaturas de recocido. Las temperaturas de fusión, congelación y transición vítreo indican que la formulación principal tiene un colapso mínimo de la torta liofilizada, ya que están por encima de las temperaturas de transición vítreo.

La Figura 27 es una clave de leyenda para la Figura 28.

65

La Figura 28 es una serie de gráficos que muestran que las PBMC se tiñeron con diferentes formulaciones de NI-0401 o controles de placebo.

La Figura 29 es un gráfico de líneas que muestra diluciones cuádruples en serie que no indican diferencias marcadas en la unión de los reactivos 1-15 de NI-0401.

65

La Figura 30 muestra el protocolo de estimulación para probar la función de diferentes formulaciones de NI-0401.

La Figura 31 muestra diferentes formulaciones congeladas de NI-0401 que inducen niveles similares de proliferación.

- 5 La Figura 32 A-C es una serie de gráficos de barras que muestran que los anticuerpos liofilizados con almacenamiento a -80 °C o 50 °C muestran una capacidad estimulante diferencial.
- 10 La Figura 33 es una representación esquemática de un régimen de dosificación y un ciclo de descanso farmacéutico para una formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal de la presente descripción.
- 15 La Figura 34 es una representación esquemática de un régimen de dosificación y un ciclo de descanso farmacéutico para una terapia combinada que usa una formulación de anticuerpo anti-CD3 de la presente descripción y al menos un segundo agente para el tratamiento de la colitis ulcerosa.
- 20 La Figura 35 es una representación esquemática de un régimen de dosificación y un ciclo de descanso farmacéutico para una terapia combinada que usa una formulación de anticuerpo anti-CD3 de la presente descripción y al menos un segundo agente para el tratamiento de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- 25 La Figura 36 es una representación esquemática de un régimen de dosificación y un ciclo de descanso farmacéutico para una terapia combinada que usa una formulación de anticuerpo anti-CD3 de la presente descripción y al menos un segundo agente para el tratamiento de la diabetes tipo I.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 La presente descripción proporciona formulaciones y dosificaciones para anticuerpos monoclonales, por ejemplo anticuerpos monoclonales completamente humanos, específicos contra la cadena CD3 épsilon (CD3 $\epsilon$ ). Específicamente, la invención proporciona formulaciones orales, nasales y subcutáneas de anticuerpos anti-CD3 $\epsilon$  útiles para la inmunomodulación específica del tejido diana. A diferencia de la administración sistémica (por ejemplo, intravenosa) de anticuerpos anti-CD3, la formulación de la presente invención minimiza la inmunosupresión no deseada. Una característica superior adicional de la formulación de la invención es la capacidad de dosificar a menor concentración anticuerpos anti-CD3 de lo que era posible anteriormente debido a la naturaleza diana de la administración. Las formulaciones son útiles para tratar o aliviar un síntoma de enfermedades autoinmunes, trastornos inflamatorios, trastornos neurodegenerativos y cáncer.

### 35 Anticuerpos anti-CD3

35 La presente invención proporciona la formulación de anticuerpos específicos contra la cadena CD3 épsilon (CD3 $\epsilon$ ). Los anticuerpos específicos para la cadena CD3 épsilon (CD3 $\epsilon$ ) y sus fragmentos de unión a antígeno se denominan aquí anticuerpo anti-CD3, y las formulaciones se denominan aquí "formulaciones de anticuerpo anti-CD3". El anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoclonal.

40 Los anticuerpos anti-CD3 ejemplares comprenden una región 1 determinante de la complementariedad de la cadena pesada (CDRH1) que comprende la secuencia de aminoácidos GYGMH (SEQ ID NO: 1), una región 2 determinante de la complementariedad de cadena pesada (CDRH2) que comprende la secuencia de aminoácidos VIWYDGSKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 3), una región 3 determinante de la complementariedad de cadena pesada (CDRH3) que comprende la secuencia de aminoácidos QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 4), una región 1 determinante de la complementariedad de cadena ligera (CDRL1) que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 5), una región 2 determinante de la complementariedad de cadena ligera (CDRL2) que comprende la secuencia de aminoácidos DASN RAT (SEQ ID NO: 6), y una región 3 determinante de la complementariedad de cadena ligera (CDRL3) que comprende la secuencia de aminoácidos QQR SN WPPLT (SEQ ID NO: 7).

45 En algunos ejemplos, el anticuerpo anti-CD3 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable que comprende QVQLVESGGWQPGRSRLSCAASGFKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSK KYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLV TVSS (SEQ ID NO: 8) y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable que comprende

50 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARF SGSGSGTIDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNW PPLTFGGGT KVEIK (SEQ ID NO: 9).

55 El anticuerpo anti-CD3 de la invención comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende: QVQLVESGGWQPGRSRLSCAASGFKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSK KYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVL QSSGLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPEAE

GGPSVFLPPKPKDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQ  
 YNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSR  
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFYSLTVDKS  
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK (SEQ ID NO: 10) y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera  
 que comprende: EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAQYQQKPGQAPRLLIYDASNR  
 ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKEIKRTVAAPSV  
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL  
 SSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11). Este anticuerpo anti-CD3 se denomina  
 aquí NI-0401, Foralumab o 28F11-AE. (Véase, por ejemplo, Dean Y, Dépis F, Kosco-Vilbois M. "Combination therapies  
 10 in the context of anti-CD3 antibodies for the treatment of autoimmune diseases." Swiss Med Wkly. (2012).

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo completamente humano o un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, la formulación de anticuerpo anti-CD3 incluye un anticuerpo anti-CD3 de longitud completa. En realizaciones alternativas, la formulación de anticuerpo anti-CD3 incluye un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD3. En algunas realizaciones, la formulación de anticuerpo anti-CD3 incluye una combinación de anticuerpos anti-CD3 de longitud completa y fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a CD3.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a CD3 es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo de dominio, cadena sencilla, fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un scFv, un scAb, un dAb, un anticuerpo de cadena pesada de dominio único, o un anticuerpo de cadena ligera de dominio único. En algunas realizaciones, tal anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a CD3 es un anticuerpo monoclonal de ratón, de otro roedor, químérico, humanizado, o completamente humano.

Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo usado en las formulaciones de la descripción incluye al menos una mutación de un aminoácido. Normalmente, la mutación se encuentra en la región constante. La mutación da como resultado un anticuerpo que tiene una función efectora alterada. Una función efectora de un anticuerpo se altera alterando, es decir, potenciando o reduciendo, la afinidad del anticuerpo por una molécula efectora tal como un receptor Fc o un componente del complemento. Por ejemplo, la mutación da como resultado un anticuerpo que es capaz de reducir la liberación de citocinas de una célula T. Por ejemplo, la mutación está en la cadena pesada en el resto de aminoácido 234, 235, 265 o 297, o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, la mutación da como resultado un resto de alanina en la posición 234, 235, 265 o 297, o un resto de glutamato en la posición 235, o una combinación de los mismos.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-CD3 proporcionado aquí contiene una o más mutaciones que previenen la liberación mediada por la región constante de cadena pesada de una o más citocinas *in vivo*.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD3 o su fragmento de unión a antígeno usado en las formulaciones de la descripción es un anticuerpo completamente humano. Los anticuerpos anti-CD3 completamente humanos usados aquí incluyen, por ejemplo, una mutación L<sup>234</sup> L<sup>235</sup> → A<sup>234</sup> E<sup>235</sup> en la región Fc, de modo que la liberación de citocinas tras la exposición al anticuerpo anti-CD3 se reduce o elimina significativamente. La mutación L<sup>234</sup> L<sup>235</sup> → A<sup>234</sup> E<sup>235</sup> en la región Fc de los anticuerpos anti-CD3 proporcionados aquí reduce o elimina la liberación de citocinas cuando los anticuerpos anti-CD3 se exponen a leucocitos humanos, mientras que las mutaciones descritas a continuación mantienen una capacidad significativa de liberación de citocinas. Por ejemplo, una reducción significativa en la liberación de citocinas se define comparando la liberación de citocinas tras la exposición al anticuerpo anti-CD3 que tiene una mutación L<sup>234</sup> L<sup>235</sup> → A<sup>234</sup> E<sup>235</sup> en la región Fc con el nivel de liberación de citocinas tras la exposición a otro anticuerpo anti-CD3 que tiene una o más de las mutaciones que se describen a continuación. Otras mutaciones en la región Fc incluyen, por ejemplo, L<sup>234</sup> L<sup>235</sup> → A<sup>234</sup> A<sup>235</sup>, L<sup>235</sup> → E<sup>235</sup>, N<sup>297</sup> → A<sup>297</sup>, y D<sup>265</sup> → A<sup>265</sup>.

El término "citocina" se refiere a todas las citocinas humanas conocidas en la técnica que se unen a receptores extracelulares expresados en la superficie celular y de ese modo modulan la función celular, incluyendo, pero sin limitarse a, IL-2, IFN-gamma, TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.

## Formulaciones

La formulación anti-CD3 comprende una dosis unitaria del anticuerpo anti-CD3 en el intervalo de: alrededor de 0,1 mg a alrededor de 50 mg; alrededor de 0,1 mg a alrededor de 25 mg; o alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg. Por ejemplo, la dosis unitaria es alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9, 9,5, 10 mg o más. Preferiblemente, la dosis unitaria es 0,5 mg, 2,5 mg o 5,0 mg.

La formulación anti-CD3 puede ser líquida. Por ejemplo, la formulación líquida es acuosa. Alternativamente, la formulación anti-CD3 es un polvo liofilizado. Cuando la formulación anti-CD3 es un polvo liofilizado, se puede añadir adicionalmente un agente de volumen para proporcionar una estructura adecuada a la torta liofilizada. Este agente de volumen adicional puede aumentar la estabilidad de la torta liofilizada durante el almacenamiento. Alternativamente, este agente de volumen adicional puede ayudar en la producción de la forma de dosificación, por ejemplo cápsula oral. Los agentes de volumen se describen aquí, e incluyen polioles tales como trehalosa, manitol, maltosa, lactosa,

sacarosa, sorbitol, o glicerol, almidón, celulosa microcristalina, celulosa microcristalina de baja humedad tal como Avicel o polietilenglicoles (PEG).

- 5 La formulación de anticuerpo anti-CD3 incluye una o más sales (una sal amortiguadora), uno o más polioles y uno o más excipientes. Las formulaciones de la presente invención también pueden contener agentes amortiguadores, o conservantes. La formulación de anticuerpo anti-CD3 se amortigua en una disolución a un pH en el intervalo de alrededor de 4 a 8; en el intervalo de alrededor de 4 a 7; en el intervalo de alrededor de 4 a 6; en el intervalo de alrededor de 5 a 6; o en el intervalo de alrededor de 5,5 a 6,5. Preferiblemente, el pH es 5,5.
- 10 Los ejemplos de sales incluyen aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, bórico, fórmico, malónico, succínico, y similares. Tales sales también se pueden preparar como sales de metales alcalinos o alcalino-térreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio. Ejemplos de agentes amortiguadores incluyen fosfato, citrato, acetato, y ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES).
- 15 20 Las formulaciones de la presente invención pueden incluir un sistema amortiguador. Como se usa en esta solicitud, los términos "amortiguador" o "sistema amortiguador" se refieren a un compuesto que, normalmente en combinación con al menos otro compuesto, proporciona un sistema amortiguador en disolución que exhibe capacidad amortiguadora, es decir, la capacidad de neutralizar, dentro de límites, ya sea ácidos o bases (álcalis) con relativamente poco o ningún cambio en el pH original.
- 25 Los amortiguadores incluyen amortiguadores de borato, amortiguadores de fosfato, amortiguadores de calcio, y combinaciones y mezclas de los mismos. Los amortiguadores de borato incluyen, por ejemplo, ácido bórico y sus sales, por ejemplo borato de sodio o borato de potasio. Los amortiguadores de borato también incluyen compuestos tal como tetraborato de potasio o metaborato de potasio, que producen ácido borato o su sal en disoluciones.
- 30 35 Un sistema amortiguador de fosfato incluye uno o más fosfatos monobásicos, fosfatos dibásicos y similares. Los amortiguadores de fosfato particularmente útiles son aquellos seleccionados de sales de fosfato de metales alcalinos y/o alcalino-térreos. Ejemplos de amortiguadores de fosfato adecuados incluyen uno o más de fosfato dibásico de sodio ( $Na_2HPO_4$ ), fosfato monobásico de sodio ( $NaH_2PO_4$ ) y fosfato monobásico de potasio ( $KH_2PO_4$ ). Los componentes del amortiguador de fosfato se usan frecuentemente en cantidades de 0,01 % o hasta 0,5 % (p/v), calculado como ion fosfato.
- 40 45 Opcionalmente se pueden añadir otros compuestos amortiguadores conocidos según las formulaciones de CD3, por ejemplo citratos, bicarbonato de sodio, TRIS, y similares. Otros ingredientes de la disolución, aunque tienen otras funciones, también pueden afectar la capacidad amortiguadora. Por ejemplo, el EDTA, usado a menudo como agente complejante, puede tener un efecto notable sobre la capacidad amortiguadora de una disolución.
- 50 Las sales preferidas para uso en las formulaciones descritas aquí incluyen cloruro de sodio, acetato de sodio, acetato de sodio trihidrato y citrato de sodio. Las formulaciones de la invención comprenden acetato de sodio trihidrato y cloruro de sodio.
- 55 La concentración de sal en las formulaciones según la invención está entre alrededor de 10 mM y 500 mM, entre alrededor de 25 mM y 250 mM, entre alrededor de 25 mM y 150 mM.
- 60 65 El acetato de sodio trihidrato está a una concentración en el intervalo de alrededor de 10 mM a 100 mM. Por ejemplo, el acetato de sodio trihidrato está en alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mM. Preferiblemente, el acetato de sodio trihidrato está en 25 mM.
- 70 75 El cloruro de sodio en una concentración en el intervalo de alrededor de 50 mM a 500 mM. Por ejemplo, el cloruro de sodio está en alrededor de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 o 500 mM. Preferiblemente, el cloruro de sodio está en una concentración de alrededor de 125 mM.
- 80 85 El citrato de sodio está en una concentración en el intervalo de alrededor de 10 mM a 100 mM. Por ejemplo, el citrato de sodio está en alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mM. Preferiblemente, el citrato de sodio está en el intervalo de alrededor de 25 a 50 mM.
- 90 95 En algunas realizaciones, la sal es acetato de sodio trihidrato en una concentración en el intervalo de alrededor de 25 mm a 100 mm y cloruro de sodio en una concentración en el intervalo de alrededor de 150 mm a 500 mm.
- 100 Preferiblemente, la formulación incluye alrededor de 25 mM de acetato de sodio trihidrato y alrededor de 150 mM de cloruro de sodio.
- 105 110 La formulación incluye uno o más polioles como agente de volumen y/o excipientes estabilizantes. Los polioles incluyen, por ejemplo, trehalosa, manitol, maltosa, lactosa, sacarosa, sorbitol, o glicerol. Las formulaciones de la

invención comprenden trehalosa. Los polioles están en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a 50 % o, en realizaciones de la invención, 5 % a 25 %. Por ejemplo, el poliol está en alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 %.

5 En realizaciones, el poliol es trehalosa en una concentración en el intervalo de alrededor de 5 % a 25 %. Por ejemplo, la trehalosa está en alrededor de 5, 10, 15, 20 o 25 %. Preferiblemente, la trehalosa está en una concentración de alrededor de 10 % o alrededor de 20 %. Lo más preferible, la trehalosa está en una concentración de alrededor de 20 %.

10 En algunos ejemplos, el poliol es sorbitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es glicerol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %.

15 En algunos ejemplos, el poliol es manitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es maltosa en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %.

20 La formulación incluye uno o más excipientes y/o tensioactivos para suprimir o reducir de otro modo la agregación de anticuerpos. Los excipientes adecuados para reducir la agregación de anticuerpos incluyen, a título de ejemplo no limitativo, un tensioactivo tal como, a título de ejemplo no limitativo, Polisorbato 20 o Polisorbato 80. Las formulaciones de la invención comprenden Polisorbato 80. En algunos ejemplos, el Polisorbato 20 o Polisorbato 80 está presente en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,01 a 1 %, o alrededor de 0,01 a 0,05 %. Por ejemplo, el Polisorbato 20 o Polisorbato 80 tiene una concentración de alrededor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 %.

25 Preferiblemente, el tensioactivo es Polisorbato 80 en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,01 a 0,05 %. Más preferentemente, el Polisorbato 80 está en 0,02 %.

30 La formulación incluye uno o más excipientes para reducir la oxidación de anticuerpos. Los excipientes adecuados para reducir la oxidación de anticuerpos incluyen, a título de ejemplo no limitativo, antioxidantes. Los antioxidantes incluyen, por ejemplo, metionina, D-arginina, BHT o ácido ascórbico. El antioxidante está presente en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,01 % a 1 %; 0,1 % a 1 %; o, en realizaciones de la invención, 0,1 % a 0,5 %. En realizaciones de la invención, el antioxidante es metionina. En algunas realizaciones, la metionina está presente en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a 0,5 %. Por ejemplo, la metionina está presente en una concentración de alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 %. Preferiblemente, la metionina está en alrededor de 0,1 %.

35 La formulación incluye uno o más agentes quelantes, tal como por ejemplo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El agente quelante está en una concentración en el intervalo de 0,01 % a 1%; 0,1 % a 1%; o, 0,1 % a 0,5 %. Por ejemplo, el agente quelante está presente en una concentración de alrededor de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 %. Preferiblemente, el agente quelante es EDTA en una concentración de alrededor de 0,1 %.

40 En algunas realizaciones, la formulación incluye uno o más excipientes para aumentar la estabilidad. En algunas realizaciones, el excipiente para aumentar la estabilidad es seroalbúmina humana. En algunas realizaciones, la seroalbúmina humana está presente en el intervalo de alrededor de 1 mg a alrededor de 5 mg.

45 En algunas realizaciones, la formulación incluye estearato de magnesio (estearato de magnesio), un aminoácido, o tanto estearato de magnesio como un aminoácido. Los aminoácidos adecuados incluyen, por ejemplo, leucina, arginina, histidina, o combinaciones de los mismos.

50 En algunas realizaciones, uno o más excipientes adicionales es celulosa microcristalina de baja humedad, tal como Avicel, polietilenglicoles (PEG), o un almidón.

55 Otros ejemplos de vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables útiles para las formulaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aglutinantes, cargas, disgregantes, lubricantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, y agentes de recubrimiento tales como: AGLUTINANTES: almidón de maíz, almidón de patata, otros almidones, gelatina, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, de xantano, alginato de sodio, ácido algínico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica), polivinilpirrolidona (por ejemplo, povidona, crosovidona, copovidona, etc.), metilcelulosa, Methocel, almidón pregelatinizado (por ejemplo, STARCH 1500® y STARCH 1500 LM®, vendidos por Colorcon, Ltd.), hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina (FMC Corporation, Marcus Hook, PA, EE. UU.), Emdex, Plasdone, o mezclas de los mismos, CARGAS: talco, carbonato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), fosfato de calcio dibásico, fosfato de calcio tribásico, sulfato de calcio (por ejemplo, gránulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caolín, manitol, ácido silílico, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, dextrosa, fructosa, miel, lactosa anhidrato, lactosa monohidrato, lactosa y

aspartamo, lactosa y celulosa, lactosa y celulosa microcristalina, maltodextrina, maltosa, manitol, celulosa microcristalina y goma guar, melazas, sacarosas o mezclas de los mismos, DISGREGANTES: agar-agar, ácido algínico, carbonato cálcico, celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica, crospovidona, polacrilina potásica, glicolato de almidón sódico (tal como Explotab), almidón de patata o tapioca, otros almidones, almidón pregelatinizado,

5 arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas (como gellán), hidroxipropilcelulosa poco sustituida, Polyplasdone, o mezclas de los mismos, LUBRICANTES: estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, Compritol, ácido esteárico, laurilsulfato de sodio, estearil fumarato de sodio (tal como Pruv), lubricantes de ácidos grasos de base vegetal, talco, aceite vegetal hidrogenado (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo,

10 aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja), estearato de zinc, oleato de etilo, laurato de etilo, agar, gel de sílice siloide (AEROSIL 200, WR Grace Co., Baltimore, MD EE.UU.), un aerosol coagulado de sílice sintética (Deaussa Co., Piano, TX EE.UU.), un dióxido de silicio pirogénico (CAB-O-SIL, Cabot Co., Boston, MA EE.UU.), o mezclas de los mismos, AGENTES ANTIAGLOMERANTES: silicato de calcio, silicato de magnesio, dióxido de silicio, dióxido de silicio

15 coloidal, talco, o mezclas de los mismos, AGENTES ANTIMICROBIANOS: cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, butilparabeno, cloruro de cetilpiridinio, cresol, clorobutanol, ácido deshidroacético, etilparabeno, metilparabeno, fenol, alcohol feniletílico, fenoxietanol, acetato fenilmercúrico, nitrato

desmolidiáctico, citoparásico, metiparabenos, fenol, ácido formílico, fenoxietanol, acetato fermitercianos, nitrito fenilmercúrico, sorbato de potasio, propilparabeno, benzoato de sodio, deshidroacetato de sodio, propionato de sodio, ácido súrbico, timerosal, timol, o mezclas de los mismos, ANTOXIDANTES: ácido ascórbico, BHA, BHT, EDTA, o mezclas de los mismos, y AGENTES DE RECUBRIMIENTO: carboximetilcelulosa de sodio, acetato-ftalato de celulosa,

20 etilcelulosa, gelatina, glaseado farmacéutico, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetylcelulosa (hipromelosa), ftalato de hidroxipropilmetylcelulosa, metilcelulosa, polietilenglicol, acetato-ftalato de polivinilo, goma laca, sacarosa, dióxido de titanio, cera de carnaúba, cera microcristalina, goma gellán, maltodextrina, metacrilatos, celulosa microcristalina y carragenina, o mezclas de los mismos.

25 La formulación también puede incluir otros excipientes y categorías de los mismos que incluyen, pero no se limitan a, Pluronic®, poloxámeros (tales como Lutrol® y Poloxamer 188), ácido ascórbico, glutathiona, inhibidores de proteasas (por ejemplo, inhibidor de tripsina de soja, ácidos orgánicos), agentes reductores del pH, cremas y lociones (como maltodextrina y carrageninas); materiales para comprimidos masticables (como dextrosa, fructosa, lactosa monohidrato, lactosa y aspartamo, lactosa y celulosa, maltodextrina, maltosa, manitol, celulosa microcristalina y goma

30 guar, sorbitol cristalino); parenterales (como manitol y povidona); plastificantes (como sebacato de dibutilo, plastificantes para recubrimientos, acetato-ftalato de polivinilo); lubricantes en polvo (como behenato de glicerilo); cápsulas blandas de gelatina (como la disolución especial de sorbitol); esferas para recubrir (como esferas de azúcar); agentes de esferonización (como behenato de glicerilo y celulosa microcristalina); agentes de suspensión/gelificantes (como carragenina, goma gellán, manitol, celulosa microcristalina, povidona, glicolato de almidón sódico, goma

35 xantana); edulcorantes (como aspartamo, aspartamo y lactosa, dextrosa, fructosa, miel, maltodextrina, maltosa, manitol, melazas, sorbitol cristalino, disolución especial de sorbitol, sacarosa); agentes de granulación húmeda (como carbonato de calcio, lactosa anhidra, lactosa monohidrato, maltodextrina, manitol, celulosa microcristalina, povidona, almidón), caramelo, carboximetilcelulosa sódica, sabor a crema de cereza y sabor a cereza, ácido cítrico anhidro, ácido cítrico, azúcar glasé, D&C Rojo No. 33, laca de aluminio D&C Amarillo #10, edetato disódico, alcohol etílico 15

40 %, laca de aluminio FD&C Amarillo No. 6, laca de aluminio FD&C Azul #1, FD&C Azul No. 1, laca de aluminio FD&C Azul no. 2, FD&C Verde no. 3, FD&C Rojo no. 40, laca de aluminio FD&C Amarillo no. 6, FD&C Amarillo no. 6, FD&C Amarillo no. 10, palmitoestearato de glicerol, monoestearato de glicerilo, índigo carmín, lecitina, manitol, metil- y propilparabenos, glicirrincinato monoamónico, saborizante de naranja natural y artificial, glaseado farmacéutico, poloxámero 188, polidextrosa, polisorbato 20, polisorbato 80, polividona, almidón de maíz pregelatinizado, almidón

45 Pectina, goma de arroz, goma de guar, goma de xantana, goma de algas, goma de pregelatina, gelatina pregelatinizado, óxido de hierro rojo, sacarina sódica, carboximetiletéster sódico, cloruro de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio, sabor a fresa, óxido de hierro negro sintético, óxido de hierro rojo sintético, dióxido de titanio, y cera blanca.

En algunos ejemplos, la formulación anti-CD3 es un líquido, y la concentración de acetato de sodio es alrededor de 10 mM a 500 mM; la concentración de cloruro de sodio es alrededor de 10 mM a 500 mM; la concentración de polisorbato 80 es alrededor de 0,01 % a 1 % (p/v); la concentración de trehalosa es alrededor de 5 % a 50 % (p/v); y la concentración de metionina es 0,01 % a 1 % (p/v). Opcionalmente, la formulación incluye además EDTA a la concentración de alrededor de 0,01 % a 1 % (p/v). La dosis unitaria del anticuerpo anti-CD3 o de su fragmento de unión a antígeno está en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a 10 mg. En algunas realizaciones, la formulación líquida se liofiliza para formar un polvo.

55 En algunas realizaciones, la formulación anti-CD3 es un líquido, y contiene acetato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), trehalosa al 20 % (p/v), metionina al 0,1 % (p/v), y una dosis unitaria del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a 10 mg. Opcionalmente, la formulación incluye además EDTA al 0,1 % (p/v). En algunas realizaciones, la formulación líquida se liofiliza para formar un polvo.  
60

En una realización específica, la formulación líquida anti-CD3 incluye acetato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), trehalosa al 20 % (p/v), metionina al 0,1 % (p/v), y una dosis unitaria de 0,5 mg del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno. También se incluye en la invención un polvo liofilizado de esta formulación.

En una realización específica, la formulación líquida anti-CD3 incluye acetato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), trehalosa al 20 % (p/v), metionina al 0,1 % (p/v), y una dosis unitaria de 0,2,5 mg del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno. También se incluye en la invención un polvo liofilizado de esta formulación.

5 En una realización específica, la formulación líquida anti-CD3 incluye acetato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), trehalosa al 20 % (p/v), metionina al 0,1 % (p/v), y una dosis unitaria de 5,0 mg del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno. También se incluye en la invención un polvo liofilizado de esta formulación.

10 En una realización específica, la formulación líquida anti-CD3 incluye acetato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), trehalosa al 20 % (p/v), metionina al 0,1 % (p/v), EDTA al 0,1 % (p/v), y una dosis unitaria de 0,5 mg del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno. También se incluye en la invención un polvo liofilizado de esta formulación.

15 En una realización específica, la formulación líquida anti-CD3 incluye acetato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), trehalosa al 20 % (p/v), metionina al 0,1 % (p/v), EDTA al 0,1 % (p/v), y una dosis unitaria de 0,2,5 mg del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno. También se incluye en la invención un polvo liofilizado de esta formulación.

20 En una realización específica, la formulación líquida anti-CD3 incluye acetato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v), trehalosa al 20 % (p/v), metionina al 0,1 % (p/v), EDTA al 0,1 % (p/v), y una dosis unitaria de 5,0 mg del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno. También se incluye en la invención un polvo liofilizado de esta formulación.

25 En algunas realizaciones, la formulación es un polvo liofilizado, en la que la relación de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno a polisorbato 80 es alrededor de 1: 0,01 a 0,1 (p/p); la relación de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno trehalosa es alrededor de 1: 10 a 50 (p/p); la relación de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno metionina es alrededor de 1: 0,1 a 0,5 (p/p); la relación de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno de acetato de sodio es alrededor de 1:0,1 a 1,0 (p/p); y la relación de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno de cloruro sódico es alrededor de 1:0,5 a 2,0 (p/p). Opcionalmente, la formulación incluye además EDTA, en la que la relación de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno a EDTA es alrededor de 1: 0,1 a 0,5 (p/p). La dosis unitaria del anticuerpo anti-CD3 o de su fragmento de unión a antígeno está en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a 10 mg.

35 En algunas realizaciones, la formulación anti-CD3 es un polvo, por ejemplo un polvo liofilizado que tiene una dosis unitaria de alrededor de 0,1 mg a 10 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo y alrededor de 0,58 mg de acetato de sodio trihidrato, alrededor de 1,25 mg de cloruro de sodio, alrededor de 0,034 mg de polisorbato 80, alrededor de 34 mg de trehalosa y alrededor de 0,17 mg de metionina por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo. Opcionalmente, la formulación en polvo incluyó además 0,17 mg de EDTA por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo. Preferiblemente, la dosis unitaria es 0,5 mg, 2,5 mg o 5,0 mg.

40 En una realización específica, la formulación anti-CD3 es un polvo, por ejemplo un polvo liofilizado que tiene una dosis unitaria de alrededor de 0,5 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo y alrededor de 0,58 mg de acetato de sodio trihidrato, alrededor de 1,25 mg de cloruro de sodio, alrededor de 0,034 mg de polisorbato 80, alrededor de 34 mg de trehalosa y alrededor de 0,17 mg de metionina por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

45 En una realización específica, la formulación anti-CD3 es un polvo, por ejemplo un polvo liofilizado que tiene una dosis unitaria de alrededor de 0,5 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo y alrededor de 0,58 mg de acetato de sodio trihidrato, alrededor de 1,25 mg de cloruro de sodio, alrededor de 0,034 mg de polisorbato 80, alrededor de 34 mg de trehalosa y alrededor de 0,17 mg de metionina por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

50 En una realización específica, la formulación anti-CD3 es un polvo, por ejemplo un polvo liofilizado que tiene una dosis unitaria de alrededor de 2,5 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo y alrededor de 0,58 mg de acetato de sodio trihidrato, alrededor de 1,25 mg de cloruro de sodio, alrededor de 0,034 mg de polisorbato 80, alrededor de 34 mg de trehalosa y alrededor de 0,17 mg de metionina por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

55 En una realización específica, la formulación anti-CD3 es un polvo, por ejemplo un polvo liofilizado que tiene una dosis unitaria de alrededor de 5 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo y alrededor de 0,58 mg de acetato de sodio trihidrato, alrededor de 1,25 mg de cloruro de sodio, alrededor de 0,034 mg de polisorbato 80, alrededor de 34 mg de trehalosa y alrededor de 0,17 mg de metionina por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

60 En una realización específica, la formulación anti-CD3 es un polvo, por ejemplo un polvo liofilizado que tiene una dosis unitaria de alrededor de 0,5 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo y alrededor de 0,58 mg de acetato de sodio trihidrato, alrededor de 1,25 mg de cloruro de sodio, alrededor de 0,034 mg de polisorbato 80, alrededor de 34 mg de trehalosa, alrededor de 0,17 mg de EDTA y alrededor de 0,17 mg de metionina por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización específica, la formulación anti-CD3 es un polvo, por ejemplo un polvo liofilizado que tiene una dosis unitaria de alrededor de 2,5 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo y alrededor de 0,58 mg de acetato de sodio trihidrato, alrededor de 1,25 mg de cloruro de sodio, alrededor de 0,034 mg de polisorbato 80, alrededor de 34 mg de trehalosa, alrededor de 0,17 mg de EDTA y alrededor de 0,17 mg de metionina por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En una realización específica, la formulación anti-CD3 es un polvo, por ejemplo un polvo liofilizado que tiene una dosis unitaria de alrededor de 5 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo y alrededor de 0,58 mg de acetato de sodio trihidrato, alrededor de 1,25 mg de cloruro de sodio, alrededor de 0,034 mg de polisorbato 80, alrededor de 34 mg de trehalosa, alrededor de 0,17 mg de EDTA y alrededor de 0,17 mg de metionina por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

El contenido de humedad (es decir, agua) de las formulaciones según la invención (ya sea en forma líquida, liofilizada o de dosificación final (por ejemplo, cápsula) es menor que alrededor de 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 %. Preferiblemente, el contenido de humedad está en el intervalo de 2-5 %, más preferiblemente el contenido de humedad está en el intervalo de 1-2 %, lo más preferible, el contenido de humedad es menor que 1 %. Los métodos para determinar el contenido de humedad se conocen en la técnica; por ejemplo, el contenido de humedad se determina mediante valoración de Karl Fischer.

En algunas realizaciones, la osmolalidad de la formulación es alrededor de 800-950 (por ejemplo, alrededor de 825-925) mOsm/kg.

Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 de la invención (ya sea en forma líquida, liofilizada o de dosificación final (por ejemplo, cápsula) son adecuadas para el almacenamiento entre alrededor de 2 °C y alrededor de 4 °C, 15 °C o a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la formulación se almacena con un paquete de tamices moleculares desecante, para reducir la humedad durante el almacenamiento. En algunas realizaciones, la formulación se almacena en un recipiente, por ejemplo una botella u otro recipiente adecuado, con un paquete de tamices moleculares desecante, para reducir la humedad durante el almacenamiento.

Las formulaciones de la presente invención (ya sea en forma líquida, liofilizada o de dosificación final (por ejemplo, cápsula) proporcionan la estabilidad química del anticuerpo formulado y otros agentes activos opcionales de la formulación. "Estabilidad" y "estable", en este contexto, se refieren a la resistencia del anticuerpo y otros agentes activos opcionales a la degradación química y a cambios físicos tales como sedimentación, precipitación, agregación en determinadas condiciones de fabricación, y preparación, transporte y almacenamiento . Las formulaciones "estables" de la invención también retienen preferiblemente al menos 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de una cantidad inicial o de referencia en determinadas condiciones de fabricación, preparación, transporte, y/o almacenamiento. La cantidad de anticuerpo y otros agentes activos opcionales se puede determinar usando cualquier método reconocido en la técnica, por ejemplo espectrofotometría UV-Vis y cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), o SDS-PAGE.

Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 de la invención (ya sea en forma líquida, liofilizada o de dosificación final (por ejemplo, cápsula) son estables durante al menos 3 meses a 4 °C, 15 °C, o a temperatura ambiente. Las formulaciones son estables durante más de 3 meses a 4 °C o 15 °C, por ejemplo al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses y/o más de 24 meses a 4 °C, 15 °C, o temperatura ambiente.

Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 de la invención (ya sea en forma líquida, liofilizada o de dosificación final (por ejemplo, cápsula) tienen una pureza de al menos 90 %, 91 %, 92 % 95 %, 95 %, 97 %, 985, 99 % o más de IgG como cadenas pesadas y ligeras.

Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 de la invención (ya sea en forma líquida, liofilizada o de dosificación final (por ejemplo, cápsula) tienen menos de 5 %, 4%, 3%, 2%, 1 % de impurezas totales.

Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 de la invención (ya sea en forma líquida, liofilizada o de dosificación final (por ejemplo, cápsula) tienen al menos 90 %, 91 %, 92 % 95 %, 95 %, 97 %, 985, 99 % o más de monómeros de IgG.

Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 de la invención (ya sea en forma líquida, liofilizada o de dosificación final (por ejemplo, cápsula) tienen menos de 5 %, 4%, 3%, 2%, 1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 % de agregados totales de IgG.

### Formas de dosificación

Las formulaciones de la descripción pueden formularse específicamente para administración enteral, parenteral, o nasal. Las formulaciones de la invención están formuladas específicamente para administración enteral.

Para administración enteral, es decir, oral, las formulaciones pueden ser una cápsula o un comprimido. La administración parenteral incluye administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, e intraarticular, y puede ser un líquido o un polvo liofilizado en un vial sellado u otro recipiente.

5 Para administración nasal, las formulaciones pueden ser un aerosol en un vial sellado u otro recipiente adecuado.

Las cápsulas incluyen cápsulas de gel blandas o cápsulas de cubierta dura. Las cápsulas de gel blandas son un gel blando o gelatina o material similar a gelatina. Las cápsulas de cubierta dura o de gel blandas son cápsulas de HPMC. 10 Las cápsulas, de gel blando o de cubierta dura, pueden llenarse con una formulación anti-CD3 líquida o una formulación anti-CD3 en polvo, por ejemplo liofilizada. Se describen más arriba formulaciones anti-CD3 líquidas y en polvo ejemplares.

En algunas realizaciones, cada cápsula incluye un recubrimiento entérico suficiente para evitar la acidez del estómago. 15 Puede usarse cualquier recubrimiento entérico adecuado en las formulaciones orales de anticuerpos anti-CD3, incluyendo, a modo de ejemplo no limitativo, recubrimientos entéricos tales como Eudragit®, por ejemplo, Eudragit® L 30 D/L 100-55, que libera el anticuerpo anti-CD3 a un pH por encima de 4 o 5.

En algunas realizaciones, cada cápsula en la formulación oral de anticuerpo anti-CD3 comprende un gel blando o gelatina o material similar a gelatina que tiene un tamaño en el intervalo de 0 a 2, por ejemplo un tamaño 0, un tamaño 20 1 y/o un tamaño 2.

En algunas realizaciones, la cápsula en la formulación oral de anticuerpo anti-CD3 es una cápsula dura llena de líquido (LFHC). Se puede usar cualquier LFHC adecuada en la formulación oral de anticuerpo anti-CD3 de la descripción, 25 incluyendo, a modo de ejemplo no limitativo, Licaps® y otras LFHC de Capsugel®.

En algunas realizaciones, cada cápsula llena de líquido en la formulación oral de anticuerpo anti-CD3 contiene un volumen menor que alrededor de 1000 µl, por ejemplo, menor que alrededor de 75 µl, y/o menor que alrededor de 500 µl. En algunas realizaciones, cada cápsula llena de líquido en la formulación oral de anticuerpo anti-CD3 contiene un volumen en un intervalo de alrededor de 50 µl a alrededor de 1000 µl, de alrededor de 100 µl a alrededor de 1000 µl, 30 de alrededor de 200 µl a alrededor de 1000 µl, de alrededor de 250 µl a alrededor de 1000 µl, de alrededor de 50 µl a alrededor de 500 µl, de alrededor de 100 µl a alrededor de 500 µl, de alrededor de 200 µl a alrededor de 500 µl, y/o de alrededor de 250 µl a alrededor de 500 µl.

35 Una formulación oral preferida incluye una cápsula oral con recubrimiento entérico que contiene una formulación liofilizada de anticuerpo anti-CD3 que tiene una dosis unitaria de alrededor de 0,1 mg a 10 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, y alrededor de 0,58 mg de acetato de sodio trihidrato, alrededor de 1,25 mg de cloruro de sodio, alrededor de 0,034 mg de polisorbato 80, alrededor de 34 mg de trehalosa y alrededor de 0,17 mg de metionina por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo. Opcionalmente, la cápsula oral con recubrimiento entérico incluye además 0,17 mg de EDTA por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo. La dosis unitaria es 0,5 mg, 2,5 mg o 5,0 mg.

40 Otra formulación oral preferida incluye una cápsula oral con recubrimiento entérico que contiene una formulación líquida de anticuerpo anti-CD3 que comprende una dosis unitaria de alrededor de 0,1 mg a 10 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, acetato de sodio trihidrato 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, 45 0,02 % de polisorbato 80 (p/v), 20 % de trehalosa (p/v) y 0,1 % de metionina (p/v). Opcionalmente, la cápsula oral con recubrimiento entérico incluye además 0,1 % de EDTA. La dosificación unitaria es 0,5 mg, 2,5 mg o 5,0 mg.

45 En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 es una formulación subcutánea. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea se aloja en un vial sellado u otro recipiente.

50 En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea incluye un anticuerpo anti-CD3, al menos una sal, al menos un tensioactivo, y un volumen de agua necesario para llevar la formulación al volumen de inyección deseado.

55 En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea incluye alrededor de 2 mg/ml del anticuerpo anti-CD3, alrededor de 7,31 mg de cloruro de sodio, alrededor de 3,40 mg de acetato de sodio trihidrato, alrededor de 0,20 mg de polisorbato 80, y agua en una cantidad para llevar el volumen de formulación hasta 1 ml para el volumen de inyección deseado. La formulación subcutánea anti-CD3 debe tener un pH en el intervalo de alrededor de 4 a 6.

60 En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea se almacena en un vial u otro recipiente adecuado bajo refrigeración, por ejemplo en el intervalo de alrededor de 2 °C a alrededor de 8 °C. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea no se agita. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea no se congela. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea se diluye antes de la administración.

65

En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea se administra en una dosis en un intervalo de alrededor de 1 mg/60 kg de peso corporal a alrededor de 10 mg/60 kg de peso corporal.

- 5 En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 es una formulación nasal. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal es una formulación en aerosol. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal es adecuada para administraciones una vez al día. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal proporciona un aerosol de un anticuerpo anti-CD3 en una dosis en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg una vez al día. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal proporciona un aerosol de un fragmento de anticuerpo anti-CD3 en una dosis en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg una vez al día. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal proporciona un aerosol de un anticuerpo anti-CD3 en una dosis en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg una vez al día.
- 10 15 En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal comprende una población de partículas que tienen un tamaño de partícula en el intervalo de alrededor de 1 mm a alrededor de 5 mm.
- 20 Las partículas de una formulación de partículas tienen diámetros de entre alrededor de 1 mm y alrededor de 5 mm, por ejemplo menos de 5 mm de diámetro, menos de 4 mm de diámetro, menos de 3 mm de diámetro, menos de 2 mm de diámetro, y alrededor de 1 mm de diámetro.
- 25 30 Las partículas de una formulación de partículas que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo tienen diámetros promedio de entre alrededor de 0,1 mm y alrededor de 50 mm. Las partículas de una formulación de partículas que comprende un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo tienen diámetros promedio de entre alrededor de 1 mm y alrededor de 10 mm, por ejemplo menos de 10 mm de diámetro promedio, menos de 9 mm de diámetro promedio, menos de 8 mm de diámetro promedio, menos de 7 mm de diámetro promedio, menos de 6 mm de diámetro promedio, menos de 5 mm de diámetro promedio, menos de 4 mm de diámetro promedio, menos de 3 mm de diámetro promedio, y alrededor de 2 mm de diámetro promedio. En algunos ejemplos, las partículas tienen diámetros promedio de entre alrededor de 2 mm y 5 mm. En algunos ejemplos, las partículas tienen un diámetro promedio entre 2 mm y 5 mm, en los que cada partícula tiene menos de alrededor de 50 mm de diámetro.
- 35 40 En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye un anticuerpo anti-CD3 de longitud completa. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a CD3. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye una combinación de anticuerpos anti-CD3 de longitud completa y fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a CD3.
- 45 50 En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye una disolución que comprende un anticuerpo anti-CD3 en una dosis en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg, un amortiguador de citrato en una concentración en el intervalo de alrededor de 25 mm a alrededor de 50 mm, y una sal en una concentración de alrededor de 150 mm, en la que la disolución tiene un pH en el intervalo de alrededor de 4 a 6. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye una disolución que comprende un anticuerpo anti-CD3 en una dosis en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg, un amortiguador de citrato de sodio en una concentración en el intervalo de alrededor de 25 mm a alrededor de 50 mm, y cloruro de sodio en una concentración de alrededor de 150 mm, en la que la disolución tiene un pH en el intervalo de alrededor de 4 a 6.
- 55 60 En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye una disolución que comprende un fragmento de anticuerpo anti-CD3 en una dosis en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg, un amortiguador de citrato en una concentración en el intervalo de alrededor de 25 mm a alrededor de 50 mm, y una sal en una concentración de alrededor de 150 mm, en la que la disolución tiene un pH en el intervalo de alrededor de 4 a 6. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye una disolución que comprende un fragmento de anticuerpo anti-CD3 en una dosis en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg, un amortiguador de citrato de sodio en una concentración en el intervalo de alrededor de 25 mm a alrededor de 50 mm, y cloruro de sodio en una concentración de alrededor de 150 mm, en la que la disolución tiene un pH en el intervalo de alrededor de 4 a 6.
- 65 En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye una disolución que comprende un anticuerpo NI-0401 de longitud completa en una dosis en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg, un amortiguador de citrato en una concentración en el intervalo de alrededor de 25 mm a alrededor de 50 mm, y una sal en una concentración de alrededor de 150 mm, en la que la disolución tiene un pH en el intervalo de alrededor de 4 a 6. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye una disolución que comprende un anticuerpo NI-0401 de longitud completa en una dosis en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg, un amortiguador de citrato de sodio en una concentración en el intervalo de alrededor de 25 mm a alrededor de 50 mm, y cloruro de sodio en una concentración de alrededor de 150 mm, en la que la disolución tiene un pH en el intervalo de alrededor de 4 a 6.

- En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye una disolución que comprende un fragmento de anticuerpo NI-0401 en una dosis en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg, un amortiguador de citrato en una concentración en el intervalo de alrededor de 25 mm a alrededor de 50 mm, y una sal en una concentración de alrededor de 150 mm, en la que la disolución tiene un pH en el intervalo de alrededor de 4 a 6. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye una disolución que comprende un fragmento de anticuerpo NI-0401 en una dosis en el intervalo de alrededor de 0,1 mg a alrededor de 10 mg, un amortiguador de citrato de sodio en una concentración en el intervalo de alrededor de 25 mm a alrededor de 50 mm, y cloruro de sodio en una concentración de alrededor de 150 mm, en la que la disolución tiene un pH en el intervalo de alrededor de 4 a 6.
- En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye uno o más polioles como excipientes estabilizantes. En algunos ejemplos, el poliol es manitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1% a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es trehalosa en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1% a alrededor de 1 %. En algunos ejemplos, el poliol es sorbitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es glicerol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es manitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, y trehalosa en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 1 %. En algunos ejemplos, el poliol es manitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, y sorbitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye uno o más polioles como excipientes estabilizantes, y glicerol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es trehalosa en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 1 %, y sorbitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es trehalosa en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 1 %, y glicerol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es sorbitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %, y glicerol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es manitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, trehalosa en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 1 %, y sorbitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es manitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, trehalosa en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 1 %, y glicerol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es trehalosa en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, sorbitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %, y glicerol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %. En algunos ejemplos, el poliol es manitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 10 %, trehalosa en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,1 % a alrededor de 1 %, sorbitol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %, y el poliol es glicerol en una concentración en el intervalo de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %.
- En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal incluye uno o más tensioactivos tales como, a modo de ejemplo no limitativo, Polisorbato 20 o Polisorbato 80. En algunos ejemplos, el Polisorbato 20 o el Polisorbato 80 está presente en una concentración en el intervalo de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,05 %.
- En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal es adecuada para almacenamiento a alrededor de 2 °C y alrededor de 4 °C. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal se almacena en un vial sellado u otro recipiente adecuado. En algunos ejemplos, la formulación de anticuerpo anti-CD3 nasal se almacena en un vial sellado u otro recipiente adecuado a alrededor de 2 °C y alrededor de 4 °C.
- Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas según la descripción se realizará con vehículos, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar transferencia, administración, tolerancia, y similares mejorados. En el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos se pueden encontrar multitud de formulaciones adecuadas: Remington's Pharmaceutical Sciences (15.<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), en particular el capítulo 87 de Blaug, Seymour, allí incluido. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (cationicos o aniónicos) (tales como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de carbowax (polietilenglicoles de distintos pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias según la presente invención, siempre que el ingrediente activo en la formulación no sea inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véanse también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci.89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998), y las citas allí, para obtener información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

### Administración terapéutica

- 5 Las formulaciones terapéuticas proporcionadas aquí, que incluyen una formulación de anticuerpo anti-CD3 descrita aquí, se usan para tratar o aliviar un síntoma asociado con un trastorno relacionado con el sistema inmune, tal como, por ejemplo, una enfermedad autoinmune o un trastorno inflamatorio. La formulación de anticuerpo anti-CD3 descrita aquí también se usa para tratar o aliviar un síntoma asociado con un trastorno neurodegenerativo o cáncer.
- 10 Las enfermedades autoinmunes incluyen, por ejemplo, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA, que es una enfermedad viral con un componente autoinmune), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, enfermedad autoinmune del oído interno (AIED), síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), púrpura trombocitopénica autoinmune (ATP), enfermedad de Behcet, miocardiopatía, enfermedad celíaca-dermatitis herpetiforme; síndrome de disfunción inmune por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), penfigoide cicatricial, enfermedad de aglutininas frías, síndrome de la cresta, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), fibromialgia-fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes mellitus insulinodependiente (diabetes tipo 1; diabetes tipo 2), artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, esclerosis múltiple, miastenia grave, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), anemia perniciosa, panarteritis nudosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (PSS), también conocida como esclerosis sistémica (SS)), síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo, y granulomatosis de Wegener.
- 15 Los trastornos inflamatorios incluyen, por ejemplo, trastornos inflamatorios crónicos y agudos. Ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen enfermedad de Alzheimer, asma, alergia atópica, alergia, aterosclerosis, asma bronquial, eczema, glomerulonefritis, enfermedad de injerto contra hospedante, anemias hemolíticas, enfermedad inflamatoria intestinal (EI), esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD), osteoartritis, septicemia, accidente cerebrovascular, trasplante de tejidos y órganos, vasculitis, retinopatía diabética, y lesión pulmonar inducida por ventilador.
- 20 30 Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 se administran a un sujeto que padece un trastorno relacionado con el sistema inmune, tal como una enfermedad autoinmune o un trastorno inflamatorio, un trastorno neurodegenerativo o cáncer. Un sujeto que padece una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno neurodegenerativo o cáncer se identifica mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los sujetos que padecen una enfermedad autoinmune, tal como enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o enfermedad inflamatoria intestinal, se identifican usando cualquiera de una variedad de pruebas clínicas y/o de laboratorio, tales como examen físico, examen radiológico, y análisis de sangre, orina y heces, para evaluar el estado inmunológico. Por ejemplo, a los pacientes que padecen esclerosis múltiple se les identifica, por ejemplo usando imágenes por resonancia magnética, por la presencia de lesiones del sistema nervioso central (SNC) que están diseminadas en el tiempo y el espacio (es decir, que ocurren en diferentes partes del SNC con al menos tres meses de diferencia). Los pacientes que padecen artritis reumatoide se identifican usando, por ejemplo, análisis de sangre y/o radiografías u otras evaluaciones de imágenes. Los pacientes que padecen diabetes tipo 1 se identifican, por ejemplo, cuando tres de estas pruebas dan positivo, seguidas de una segunda prueba positiva en un día diferente: (1) glucosa plasmática en ayunas mayor o igual a 126 mg/dl con síntomas de diabetes; (2) glucosa plasmática casual (tomada en cualquier momento del día) mayor o igual a 200 mg/dl con síntomas de diabetes; o (3) valor de la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) mayor o igual a 200 mg/dl medido en un intervalo de dos horas (la OGTT se administra durante un lapso de tres horas).
- 35 40 45 50 55 60 65
- La administración de una formulación de anticuerpo anti-CD3 a un paciente que padece un trastorno relacionado con el sistema inmune, tal como una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno neurodegenerativo o cáncer, se considera exitosa si se logra cualquiera de una variedad de resultados clínicos o de laboratorio. Por ejemplo, la administración de una formulación de anticuerpo anti-CD3 a un paciente que padece un trastorno relacionado con el sistema inmune, tal como una enfermedad autoinmune o un trastorno inflamatorio, se considera exitosa si uno o más de los síntomas asociados con el trastorno se alivia, reduce, inhibe o no progresan a un estado posterior, es decir, empeora. La administración de una formulación de anticuerpo anti-CD3 a un paciente que padece un trastorno relacionado con el sistema inmune, tal como una enfermedad autoinmune o un trastorno inflamatorio, se considera exitosa si el trastorno, por ejemplo un trastorno autoinmune, entra en remisión o no progresan a un estado posterior, es decir, empeora.
- En otra realización, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se usan en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La esteatohepatitis no alcohólica es una enfermedad del hígado graso debida a causas distintas al alcohol. NASH se asocia con síntomas tales como anemia; fatiga; pérdida de peso; debilidad y, en etapas tardías, cirrosis. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran a un sujeto que padece, ha sido diagnosticado o está predisposto a NASH. Las

formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran en una dosis que es suficiente para aliviar al menos un síntoma de NASH, para tratar NASH, para prevenir NASH, y/o para evitar que NASH progrese a un estado patológico adicional en un sujeto.

- 5 Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se usan en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención del trastorno inflamatorio intestinal (EII). La EII es la inflamación crónica e irritación del tejido del tubo digestivo (GI). La EII se asocia con síntomas tales como calambres y dolor abdominal, diarrea, sangrado rectal, fiebre, y recuento elevado de glóbulos blancos. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran a un sujeto que padece, ha sido diagnosticado o está predisposto a EII. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran en una dosis que es suficiente para aliviar al menos un síntoma de EII, para tratar EII, para prevenir EII, y/o para evitar que EII progrese a un estado patológico adicional en un sujeto.

En otra realización, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se usan en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de la colitis ulcerosa. La colitis ulcerosa es la inflamación e irritación crónica del colon. La colitis ulcerosa se asocia con síntomas tales como anemia; fatiga; pérdida de peso; pérdida de apetito; sangrado rectal; pérdida de líquidos y nutrientes corporales; lesiones de la piel; dolor en las articulaciones; y retraso del crecimiento (específicamente en niños). Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran a un sujeto que padece, ha sido diagnosticado o está predisposto a colitis ulcerosa. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran en una dosis que es suficiente para aliviar al menos un síntoma de colitis ulcerosa, para tratar la colitis ulcerosa, para prevenir la colitis ulcerosa, y/o para evitar que la colitis ulcerosa progrese a un estado patológico adicional en un sujeto.

En otra realización, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se usan en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de la enfermedad de Crohn. La enfermedad de Crohn es la inflamación e irritación crónica de los intestinos. La enfermedad de Crohn se asocia con síntomas tales como dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso, falta de apetito, fiebre, sudores nocturnos, dolor rectal y sangrado rectal. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran a un sujeto que padece, ha sido diagnosticado o está predisposto a la enfermedad de Crohn. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran en una dosis que es suficiente para aliviar al menos un síntoma de la enfermedad de Crohn, para tratar la enfermedad de Crohn, para prevenir la enfermedad de Crohn, y/o para evitar que la enfermedad de Crohn progrese a un estado patológico adicional en un sujeto.

En otra realización, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se usan en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de la esclerosis múltiple (EM). La EM es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta el sistema nervioso central (SNC). Los síntomas de la EM incluyen, por ejemplo, cambios en las sensaciones, problemas visuales, debilidad muscular, depresión, dificultades con la coordinación y el habla, y dolor. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran a un sujeto que padece, ha sido diagnosticado o está predisposto a EM. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran en una dosis que es suficiente para aliviar al menos un síntoma de EM, para tratar EM, para prevenir EM, y/o para evitar que EM progrese a un estado patológico adicional en un sujeto.

En otra realización, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se usan en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de lupus. El lupus es una enfermedad inflamatoria crónica que ocurre cuando tu sistema inmunológico del cuerpo ataca sus propios tejidos y órganos. La inflamación causada por el lupus puede afectar muchos sistemas corporales diferentes, incluyendo las articulaciones, la piel, los riñones, las células sanguíneas, el cerebro, el corazón y los pulmones. Los signos y síntomas del lupus que experimente dependerán de los sistemas corporales afectados por la enfermedad. Los signos y síntomas más comunes incluyen: fatiga y fiebre, dolor en las articulaciones, rigidez e hinchazón, erupción en forma de mariposa en la cara que cubre las mejillas y el puente de la nariz, lesiones en la piel que aparecen o empeoran con la exposición al sol (fotosensibilidad), dedos de manos y pies que se vuelven blancos o azules cuando se exponen al frío o durante períodos estresantes (fenómeno de Raynaud), dificultad para respirar, dolor en el pecho, ojos secos, cefaleas, confusión y pérdida de memoria. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran a un sujeto que sufre, ha sido diagnosticado o está predisposto a padecer lupus. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran en una dosis que es suficiente para aliviar al menos un síntoma de lupus, para tratar el lupus, para prevenir el lupus, y/o para evitar que el lupus progrese a un estado patológico adicional en un sujeto.

En otra realización, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se usan en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE). La EAE es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta el sistema nervioso central (SNC). Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran en una dosis que es suficiente para aliviar al menos un síntoma de EAE, para tratar EAE, para prevenir EAE, y/o para evitar que EAE progrese a un estado patológico adicional en un sujeto.

En otra realización, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se usan en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de la diabetes mellitus insulinodependiente (diabetes tipo I). La diabetes tipo I es una enfermedad caracterizada por hiperglucemia persistente (niveles elevados de azúcar en sangre) como resultado de una secreción inadecuada de la hormona insulina. La diabetes tipo I se caracteriza por la pérdida de las células beta

- productoras de insulina de los islotes de Langerhans del páncreas. La diabetes tipo I es un trastorno autoinmune en el que el propio sistema inmune del cuerpo ataca las células beta en los islotes de Langerhans del páncreas, destruyéndolas o dañándolas lo suficiente como para reducir o eliminar la producción de insulina. Los síntomas de la diabetes tipo I incluyen, por ejemplo, aumento de la sed, aumento de la micción, pérdida de peso a pesar del aumento del apetito, náuseas, vómitos, dolor abdominal, y fatiga. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran a un sujeto que sufre, ha sido diagnosticado o está predisposto a padecer diabetes tipo I. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran en una dosis que es suficiente para aliviar al menos un síntoma de diabetes tipo I, para tratar diabetes tipo I, para prevenir diabetes tipo I, y/o para evitar que diabetes tipo I progrese a un estado patológico adicional en un sujeto.
- En otra realización, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se usan en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de diabetes tipo II. La diabetes tipo II es una enfermedad que es un trastorno metabólico a largo plazo que se caracteriza por hiperglucemia, resistencia a la insulina, y una relativa falta de insulina. Los síntomas comunes incluyen aumento de la sed, micción frecuente, y pérdida de peso inexplicable. Los síntomas también pueden incluir aumento del hambre, sensación de cansancio, y llagas que no sanan. A menudo, los síntomas aparecen lentamente. Las complicaciones a largo plazo de la hiperglucemia incluyen enfermedades cardíacas, accidentes cerebrovasculares, retinopatía diabética que puede provocar ceguera, insuficiencia renal, y flujo sanguíneo deficiente en las extremidades que puede provocar amputaciones. Puede ocurrir la aparición repentina de un estado hiperglucémico hiperosmolar; sin embargo, la cetoacidosis es poco común. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran a un sujeto que sufre, ha sido diagnosticado o está predisposto a padecer diabetes tipo II. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran en una dosis que es suficiente para aliviar al menos un síntoma de diabetes tipo II, para tratar diabetes tipo II, para prevenir diabetes tipo II, y/o para evitar que diabetes tipo II progrese a un estado patológico adicional en un sujeto.
- En otra realización, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se usan en el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de artritis reumatoide (AR). La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que causa inflamación crónica de las articulaciones. La artritis reumatoide también puede causar inflamación del tejido alrededor de las articulaciones, así como de otros órganos del cuerpo. La AR se asocia con síntomas tales como fatiga, falta de apetito, fiebre baja, dolores musculares y articulares, y rigidez. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran a un sujeto que padece, ha sido diagnosticado o está predisposto a AR. Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran en una dosis que es suficiente para aliviar al menos un síntoma de AR, para tratar AR, para prevenir AR, y/o para evitar que AR progrese a un estado patológico adicional en un sujeto.
- La presente invención también proporciona formulaciones para uso en un método para tratar o aliviar un síntoma asociado con un trastorno relacionado con el sistema inmune o un síntoma asociado con el rechazo después de un trasplante de órgano. Por ejemplo, las formulaciones usadas aquí se usan para tratar o aliviar un síntoma de cualquiera de las enfermedades autoinmunitarias y trastornos inflamatorios proporcionados aquí.
- Las formulaciones terapéuticas usadas aquí también se usan como agentes inmunosupresores en trasplantes de órganos o tejidos. Como se usa aquí, "agente inmunosupresor" se refiere a un agente cuya acción sobre el sistema inmune conduce a la reducción inmediata o retardada de la actividad de al menos una ruta implicada en una respuesta inmune, ya sea que esta respuesta se produzca de forma natural o se desencadene artificialmente, ya sea que esta respuesta tenga lugar como parte del sistema inmune innato, el sistema inmune adaptativo, o ambos. Estas formulaciones de anticuerpo anti-CD3 inmunosupresoras se administran a un sujeto antes, durante y/o después del trasplante de órganos o tejidos. Por ejemplo, una formulación de anticuerpo anti-CD3 proporcionada aquí se usa para tratar o prevenir el rechazo después de un trasplante de órganos o tejidos.
- En aún otra realización usada aquí, una formulación de anticuerpo anti-CD3 se administra a un individuo humano tras la detección de la presencia de anticuerpos autorreactivos dentro del individuo humano. Tales anticuerpos autorreactivos se conocen en la técnica como anticuerpos con afinidad de unión por una o más proteínas expresadas endógenamente dentro del individuo humano. En un aspecto usado aquí, el individuo humano se evalúa para detectar la presencia de anticuerpos autorreactivos implicados específicamente en una o más enfermedades autoinmunes como son bien conocidas en la técnica. En una realización específica, un paciente humano se evalúa para determinar la presencia de anticuerpos contra la insulina, la ácido glutámico descarboxilasa y/o la proteína IA-2, y posteriormente se le administra un anticuerpo anti-CD3 tras la detección positiva de uno o más de tales anticuerpos autorreactivos.
- En aún otra realización usada aquí, una formulación anti-CD3 se administra a un individuo humano para activar la inmunidad y la inmunomodulación de las mucosas.
- La formulación de anticuerpo anti-CD3 se usa para activar las células T reguladoras (Treg).
- En otra realización usada aquí, una composición de anticuerpo anti-CD3 se administra a sujetos humanos para prevenir, reducir o disminuir el reclutamiento de células inmunes en tejidos humanos. Un anticuerpo anti-CD3 usado aquí se administra a un sujeto que lo necesita para prevenir y tratar afecciones asociadas con el reclutamiento anormal o desregulado de células inmunes en sitios tisulares de enfermedad humana.

En otra realización usada aquí, una composición de anticuerpo anti-CD3 se administra a sujetos humanos para prevenir, reducir o disminuir la extravasación y diapédesis de células inmunes en tejidos humanos. Por tanto, los anticuerpos anti-CD3 usados aquí se administran para prevenir y/o tratar afecciones asociadas con la infiltración anormal o desregulada de células inmunes en sitios tisulares de enfermedades humanas.

En otra realización usada aquí, una composición de anticuerpo anti-CD3 se administra a sujetos humanos para prevenir, reducir o disminuir los efectos mediados por la liberación de citocinas dentro del cuerpo humano. El término "citocina" se refiere a todas las citocinas humanas conocidas en la técnica que se unen a receptores extracelulares sobre la superficie celular y de ese modo modulan la función celular, incluyendo, pero no se limitan a, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, e IL-13.

En otra realización usada aquí, una composición de anticuerpo anti-CD3 se administra a sujetos humanos para prevenir, reducir o disminuir los efectos mediados por la liberación de receptores de citocinas dentro del cuerpo humano. La expresión "receptor de citocinas" se refiere a todos los receptores de citocinas humanas en la técnica que se unen a una o más citocinas, como se define aquí, incluidos, pero sin limitarse a, receptores de las citocinas antes mencionadas. Por tanto, un anticuerpo anti-CD3 usado aquí se administra para tratar y/o prevenir afecciones mediadas por activación, unión o ligadura anormal de uno o más receptores de citocinas dentro del cuerpo humano. Se prevé además que la administración del anticuerpo anti-CD3 in vivo agotará la señalización intracelular mediada por el o los receptores de citocinas dentro de tal sujeto humano.

En un aspecto usado aquí, una composición de anticuerpo anti-CD3 se administra a un individuo humano tras la disminución de la función de las células beta pancreáticas en el mismo. En una realización, el individuo se evalúa para determinar la función de las células beta, la secreción de insulina, o los niveles de péptido c, como se conocen en la técnica. Posteriormente, al notarse una disminución suficiente de cualquiera de los indicadores, se administra al individuo humano un régimen de dosificación suficiente de un anticuerpo anti-CD3 para evitar una mayor progresión de la destrucción autoinmune de la función de las células beta en el mismo.

Preferiblemente, las formulaciones terapéuticas de anticuerpo anti-CD3 proporcionadas aquí se administran a un sujeto por vía oral, subcutánea o nasal. Se contemplan otras vías de administración. Por ejemplo, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 se administran por vía intravenosa, intramuscular, o cualquier combinación de estas vías de administración.

### Terapia combinada

La formulación de anticuerpo anti-CD3 se administra durante y/o después del tratamiento en combinación con uno o más agentes adicionales, tales como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un agente antiinflamatorio y/o un agente inmunosupresor.

En algunas realizaciones, la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el agente adicional se formulan en una única composición terapéutica, y la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el agente adicional se administran simultáneamente.

Alternativamente, la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el agente adicional están separados entre sí, por ejemplo cada uno se formula en una composición terapéutica separada, y la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el agente adicional se administran simultáneamente, o la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el agente adicional se administran en diferentes momentos durante un régimen de tratamiento. Por ejemplo, la formulación de anticuerpo anti-CD3 se administra antes de la administración del agente adicional, la formulación de anticuerpo anti-CD3 se administra después de la administración del agente adicional, o la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el agente adicional se administran de forma alterna. Como se describe aquí, la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el agente adicional se administran en dosis únicas o en dosis múltiples.

En algunas realizaciones, la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el o los agentes adicionales se administran simultáneamente. Por ejemplo, la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el o los agentes adicionales pueden formularse en una única composición o administrarse como dos o más composiciones separadas. En algunas realizaciones, la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el o los agentes adicionales se administran secuencialmente, o la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el agente adicional se administran en diferentes momentos durante un régimen de tratamiento.

La administración de una formulación de anticuerpo anti-CD3, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, a un paciente que padece una enfermedad autoinmunitaria, un trastorno inflamatorio, un trastorno neurodegenerativo o cáncer se considera exitosa si se logra cualquiera de una variedad de objetivos clínicos o de laboratorio. Por ejemplo, la administración de una formulación de anticuerpo anti-CD3, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, a un paciente que padece una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno neurodegenerativo o cáncer se considera exitosa si uno o más de los síntomas asociados con la enfermedad o trastorno se alivia, reduce, inhibe o no progresan a un estado adicional, es decir, empeora. La administración de una

formulación de anticuerpo anti-CD3, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, a un paciente que padece una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio, un trastorno neurodegenerativo o cáncer se considera exitosa si la enfermedad o trastorno entra en remisión o no progresiona hacia un estado adicional, es decir, empeora.

- 5 Los segundos agentes adecuados para uso con las composiciones y métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, un inhibidor de NF- $\kappa$ B, un GLP-1 o un compuesto que induce el reposo de células beta, mesalamina u otro fármaco 5-ASA, pentoxifilina, ácido ursodesoxicólico, un agonista de PPAR $\gamma$ , ácido todo transretinoico (ATRA), DPP-4 (gliptinas-sitagliptina), un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos (por ejemplo, cerulenina, quercetina, C7, apigenina, AICAR), un agonista de FXR (por ejemplo, activadores de sales biliares, ácido quenodesoxicólico, ácido obeticólico (OIBA, Ocaliva), fexaramina, cafestol, secuestrantes de ácidos biliares (colestiramina, colesterol, coleserelam), inhibidores de SGLT2 (ex-dapagliflozina (reduce los niveles de HbA1c), un mAb anti-IL-6R, anticuerpo anti-TNF (Remicade<sup>®</sup> (Infliximab), y Humira<sup>®</sup> (Adalimumab), Enbrel<sup>®</sup> (Etanercept), compuestos antiinflamatorios y/o inmunosupresores (por ejemplo, metotrexato, ciclosporina A, microemulsión de ciclosporina), tacrolimus, corticosteroides, estatinas, interferón beta, acetato de glatiramer (Copaxone), interferón beta-1a (Avonex), interferón beta-1b (Rebif), interferón beta-1b (Betaseron o Betaferon), mitoxantrona (Novantrone), dexametasona (Decadron), metilprednisolona (Depo-Medrol), prednisona (Deltasone), o un medicamento contra la obesidad.

En algunas realizaciones, la terapia de combinación que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se usa en el tratamiento de la colitis ulcerosa. En algunas realizaciones, la inflamación gástrica subyacente asociada con la colitis ulcerosa se suprime antes de la administración de la formulación de anticuerpo anti-CD3. En algunas realizaciones, la inflamación gástrica subyacente asociada con la colitis ulcerosa se suprime antes de la administración del agente o agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, la inflamación gástrica subyacente asociada con la colitis ulcerosa se suprime antes de la administración de la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el o los agentes terapéuticos adicionales. En algunas realizaciones, el sujeto a tratar se trata previamente con un agente antiinflamatorio que se dosifica antes del tratamiento con la formulación de anticuerpo anti-CD3. En algunas realizaciones, el sujeto a tratar se trata previamente con un agente antiinflamatorio que se dosifica antes del tratamiento con el o los agentes adicionales. En algunas realizaciones, el sujeto a tratar se trata previamente con un agente antiinflamatorio que se dosifica antes del tratamiento con la formulación de anticuerpo anti-CD3 y el o los agentes adicionales.

30 En algunas realizaciones, el segundo agente es un agente anti-interleucina 6R (IL-6R), tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-6R o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el segundo agente es uno o más agentes antiinflamatorios. En algunas realizaciones, el segundo agente es un inhibidor de NF- $\kappa$ B.

35 En algunas realizaciones, el segundo agente es ácido todo transretinoico (ATRA). ATRA se produce en niveles elevados en el intestino, y desempeña un papel importante en la inmunidad de las mucosas y la tolerancia inmunitaria. El ATRA en niveles basales es necesario para la supervivencia y activación de las células inmunes. También se sabe que ATRA ayuda en la diferenciación de las células T reguladoras (Treg).

40 En algunas realizaciones, el segundo agente es mesalamina u otro fármaco 5-ASA. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y mesalamina u otro fármaco 5-ASA se administra una vez al día durante todo el régimen de tratamiento.

45 En algunas realizaciones, el segundo agente es un anticuerpo antifactor de necrosis tumoral (TNF). Cualquier anticuerpo anti-TNF adecuado o fragmento de unión a antígeno del mismo puede usarse en las terapias combinadas que incluyen la formulación de anticuerpo anti-CD3 de la descripción, incluyendo, a modo de ejemplo no limitativo, Remicade<sup>®</sup> y Humira<sup>®</sup>.

50 En algunas realizaciones, el segundo agente es GLP-1 o un compuesto que induce el reposo de células beta (es decir, un compuesto que reduce o inhibe de otro modo la liberación de insulina, tal como abridores de canales de potasio). Ejemplos de compuestos de GLP-1 adecuados se describen, por ejemplo, en la solicitud publicada US 20040037826, y de compuestos que inducen el reposo de células beta adecuados se describen en la solicitud publicada US 20030235583.

55 En otra realización, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 usadas para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmune se administran en combinación con cualquiera de una variedad de compuestos antiinflamatorios y/o inmunosupresores conocidos. Los compuestos conocidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ciclosporina A (incluyendo, por ejemplo, microemulsión de ciclosporina), tacrolimus, corticosteroides, estatinas, interferón beta, Remicade (Infliximab), Enbrel (Etanercept) y Humira (Adalimumab).

60 Por ejemplo, en el tratamiento de la artritis reumatoide, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 usadas aquí se pueden coadministrar con corticosteroides, metotrexato, ciclosporina A, estatinas, un anticuerpo anti-IL-6R, Remicade (Infliximab), Enbrel (Etanercept) y/o Humira (Adalimumab).

65 En el tratamiento de la uveítis, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 se pueden administrar junto con, por ejemplo, corticosteroides, metotrexato, ciclosporina A, ciclofosfamida y/o estatinas. Asimismo, los pacientes que padecen una

enfermedad tal como la enfermedad de Crohn o psoriasis pueden tratarse con una combinación de una composición de anticuerpo anti-CD3 usada aquí y Remicade (Infliximab), un anticuerpo anti-IL-6R, y/o Humira (Adalimumab).

- 5 Los pacientes con esclerosis múltiple pueden recibir una combinación de una composición de anticuerpo anti-CD3 usada aquí en combinación con, por ejemplo, acetato de glatiramer (Copaxone), interferón beta-1a (Avonex), interferón beta-1a (Rebif), interferón beta-1b ( Betaseron o Betaferon), mitoxantrona (Novantrone), un anticuerpo anti-IL-6R, dexametasona (Decadron), metilprednisolona (Depo-Medrol) y/o prednisona (Deltasone) y/o estatinas.
- 10 En una realización, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 inmunosupresoras usadas aquí se administran junto con un segundo agente tal como, por ejemplo, GLP-1 o un compuesto que induce el reposo de células beta, como se describió anteriormente.
- 15 En otra realización, estas formulaciones de anticuerpo anti-CD3 inmunosupresoras se administran en combinación con cualquiera de una variedad de compuestos antiinflamatorios y/o inmunosupresores conocidos. Los compuestos antiinflamatorios y/o inmunosupresores adecuados para uso con los anticuerpos anti-CD3 usados aquí incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ciclosporina A (incluyendo, por ejemplo, microemulsión de ciclosporina), tacrolimus, corticosteroides y estatinas.
- 20 En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 34. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 34, y el régimen de dosificación se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 34, y el régimen de dosificación se repite después del período de reposo farmacológico. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 34, y el ciclo de reposo farmacológico se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 34, y el régimen de dosificación y el ciclo de reposo farmacológico se repiten. En algunas de las realizaciones anteriores, el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en ATRA, mesalamina u otro fármaco 5-ASA, y un anticuerpo anti-TNF o fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 25 En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se usa en el tratamiento de esteatohepatitis no alcohólica (NASH). NASH es una enfermedad autoinmune que se asocia con fibrosis hepática subyacente grave debido a un depósito excesivo de grasa. El ácido biliar natural, el ácido quenodesoxicólico, es el ligando fisiológico más activo para el receptor farnesoide X (FXR), que participa en muchos procesos fisiológicos y patológicos. El ácido obeticólico es el primer agonista de FXR que se usa en estudios de fármacos en seres humanos. Sin embargo, la utilidad terapéutica de OBA puede estar limitada a un subconjunto de pacientes. OBA no suprime el trastorno autoinmune. Por lo tanto, las combinaciones de un agonista de FXR con las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 de la presente descripción producen efectos sinérgicos cuando se administran en combinación.
- 30 En algunas realizaciones, el segundo agente es metformina. En algunas realizaciones, el segundo agente es metformina, administrada a una dosis de alrededor de 500 mg dos veces al día durante 44 semanas de tratamiento.
- 35 En algunas realizaciones, el segundo agente es pentoxifilina. En algunas realizaciones, el segundo agente es pentoxifilina, administrada a una dosis de alrededor de 400 mg 3 veces/día o alrededor de 600 mg dos veces al día durante 52 semanas de tratamiento.
- 40 En algunas realizaciones, el segundo agente es ácido ursodesoxicólico. En algunas realizaciones, el segundo agente es ácido ursodesoxicólico, administrado a una dosis de alrededor de 10 mg/kg/día a alrededor de 20 mg/kg/día durante 52 semanas de tratamiento.
- 45 En algunas realizaciones, el segundo agente es ácido obeticólico. En algunas realizaciones, el segundo agente es ácido obeticólico, administrado a una dosis de alrededor de 10 mg/kg/día a alrededor de 20 mg/kg/día durante 52 semanas de tratamiento.
- 50 En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el ciclo de reposo farmacológico se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el ciclo de reposo farmacológico se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite.
- 55 En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el ciclo de reposo farmacológico se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el ciclo de reposo farmacológico se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite.
- 60 En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el ciclo de reposo farmacológico se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el ciclo de reposo farmacológico se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite.
- 65 En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el ciclo de reposo farmacológico se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el ciclo de reposo farmacológico se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite.

en la Figura 35, y el régimen de dosificación y el ciclo de reposo farmacológico se repiten. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 35, y el régimen de dosificación se repite con el siguiente calendario: 5-7 días de actividad, 21-28 días de descanso. En algunas de las realizaciones anteriores, el segundo agente se selecciona del grupo que consiste en metformina, pentoxifilina, ácido ursodesoxicólico, ácido obeticólico, y combinaciones de los mismos. En algunas de las realizaciones anteriores, el segundo agente es metformina, administrada a 500 mg dos veces al día durante 44 semanas de tratamiento. En algunas de las realizaciones anteriores, el segundo agente es pentoxifilina, administrada a una dosis de 400 mg 3 veces/día o 600 mg dos veces al día durante 52 semanas de tratamiento. En algunas de las realizaciones anteriores, el segundo agente es ácido ursodesoxicólico, administrado a una dosis de 10-20 mg/kg/día durante 52 semanas de tratamiento. En algunas de las realizaciones anteriores, el segundo agente es ácido obeticólico, administrado a una dosis de 10-20 mg/kg/día durante 52 semanas de tratamiento.

En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se usa en el tratamiento de diabetes tipo I. En algunas realizaciones, el segundo agente es cualquier agente reconocido en la técnica útil en el tratamiento de la diabetes tipo I y/o la diabetes tipo II. En algunas realizaciones, el segundo agente es metformina. En algunas realizaciones, el segundo agente es metformina, y la formulación de anticuerpo anti-CD3 es una formulación oral. En algunas realizaciones, el segundo agente es metformina, y la formulación de anticuerpo anti-CD3 es una formulación de cápsula oral. En algunas realizaciones, la metformina se administra en una dosis de alrededor de 500 mg BID. En algunas realizaciones, la metformina se administra en una dosis de alrededor de 500 mg BID, y la formulación anti-CD3 se administra en una cantidad tal que la terapia combinada reduce la dependencia de la insulina en el sujeto. En algunas realizaciones, la metformina se administra a una dosis de alrededor de 500 mg BID, y la formulación anti-CD3 se administra a una población de pacientes específica. En algunas realizaciones, la metformina se administra a una dosis de alrededor de 500 mg BID, y la formulación anti-CD3 se administra a pacientes que tienen niveles séricos de péptido c en el intervalo de alrededor de 0,1 nmol/l a alrededor de 0,4 nmol/l, un nivel de HbA1c menor que 7 % y/o dependencia de insulina en el intervalo de alrededor de 0,25 U/kg/día.

En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 36. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 36, y el régimen de dosificación se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 36, y el ciclo de reposo farmacológico se repite. En algunas realizaciones, la terapia combinada que incluye una formulación de anticuerpo anti-CD3 y al menos un segundo agente terapéutico se administra en un régimen de dosificación mostrado en la Figura 36, y el régimen de dosificación y el ciclo de reposo farmacológico se repiten. En algunas de las realizaciones anteriores, el período de reposo farmacológico se basa en la mejora de los niveles séricos de péptido c y/o la reducción de HbA1c desde el valor inicial. En algunas de las realizaciones anteriores, el segundo agente es metformina.

La presente descripción también proporciona métodos para usar las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 en diversas indicaciones terapéuticas, solas o en combinación con al menos un agente adicional. En algunas realizaciones, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3, solas o en combinación con uno o más agentes adicionales, son útiles en el tratamiento de una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio.

En algunas realizaciones, una formulación oral de anticuerpo anti-CD3, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para tratar una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio. En algunas realizaciones, una formulación oral de anticuerpo anti-CD3, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para tratar el trastorno inflamatorio intestinal (EI). En algunas realizaciones, una formulación oral de anticuerpo anti-CD3, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para tratar la enfermedad de injerto contra hospedante (GvHD). En algunas realizaciones, una formulación oral de anticuerpo anti-CD3, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para tratar NASH. En algunas realizaciones, una formulación oral de anticuerpo anti-CD3, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para tratar la diabetes tipo I.

En algunas realizaciones, una formulación oral de anticuerpo anti-CD3, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para tratar la cirrosis biliar primaria (CBP). En algunas realizaciones, una formulación oral de anticuerpo anti-CD3, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para tratar la esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

En algunas realizaciones, una formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para tratar una enfermedad autoinmune y/o un trastorno inflamatorio. En algunas realizaciones, una formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para tratar la EI. En algunas realizaciones, una formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para tratar la

GvHD. En algunas realizaciones, una formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para tratar la diabetes tipo I.

- 5 En algunas realizaciones, una formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea, sola o en combinación con uno o más agentes adicionales, se usa en un método para inhibir el rechazo y/o prolongar la supervivencia del material biológico trasplantado en un sujeto. El material biológico a trasplantar es una o más células o tipos de células, uno o más tejidos o tipos de tejidos, o un órgano o porción del mismo. Por ejemplo, el material biológico a trasplantar es material biológico alogénico. En algunas realizaciones, las células de los islotes son células de los islotes alogénicas. En algunas realizaciones, el material biológico a trasplantar es o deriva de riñón, páncreas, hígado, o intestino. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el material biológico a trasplantar es o deriva de una o más células de riñón. En algunas realizaciones, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea se administra durante y/o después del trasplante. En algunas realizaciones, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea se administra durante y/o después del trasplante en combinación con uno o más agentes adicionales. En algunas realizaciones, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea y el o los agentes adicionales se administran simultáneamente. Por ejemplo, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutáneo y el o los agentes adicionales pueden formularse en una única composición o administrarse como dos o más composiciones separadas. En algunas realizaciones, la formulación de anticuerpo anti-CD3 subcutánea y el o los agentes adicionales se administran secuencialmente.
- 10
- 15

## 20 **Administración profiláctica**

- Las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 (también denominadas aquí composiciones de anticuerpo) proporcionadas aquí se usan en formulaciones de diagnóstico y profilácticas. En una realización, una formulación de anticuerpo anti-CD3 proporcionada aquí se administra a pacientes que tienen riesgo de desarrollar una de las enfermedades autoinmunes antes mencionadas. La predisposición de un paciente a una o más de las enfermedades autoinmunes antes mencionadas se puede determinar usando marcadores genotípicos, serológicos o bioquímicos. Por ejemplo, la presencia de subtipos de HLA particulares y autoanticuerpos serológicos (contra la insulina, GAD65 e IA-2) son indicativos de diabetes tipo I.
- 25
- 30 En otra realización proporcionada aquí, una formulación de anticuerpo anti-CD3 se administra a individuos humanos diagnosticados con una o más de las enfermedades autoinmunes antes mencionadas. Tras el diagnóstico, se administra un anticuerpo anti-CD3 para mitigar o revertir los efectos de la autoinmunidad. En uno de tales ejemplos, a un individuo humano diagnosticado con diabetes tipo I se le administra una dosis suficiente de un anticuerpo anti-CD3 para restaurar la función pancreática y minimizar el daño de la infiltración autoinmune en el páncreas. En otra realización, a un individuo humano diagnosticado con artritis reumatoide se le administra un anticuerpo anti-CD3 para reducir la infiltración de células inmunes y la destrucción de las articulaciones de las extremidades.
- 35

40 Preferiblemente, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 terapéuticas, de diagnóstico y/o profilácticas proporcionadas aquí se administran a un sujeto por vía intravenosa o subcutánea. Se contemplan otras vías de administración. Por ejemplo, las formulaciones de anticuerpo anti-CD3 se administran por vía intravenosa, subcutánea, oral, parenteral, nasal, intramuscular, o cualquier combinación de estas vías de administración.

## 50 **Otros aspectos de la descripción**

- 45 En otro aspecto, la descripción proporciona métodos para purificar un anticuerpo anti-CD3 mediante cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, y/o cromatografía de hidroxiapatita. Por ejemplo, la cromatografía de afinidad es la cromatografía de proteína A. La cromatografía de intercambio iónico es, por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico.
- 50 En un aspecto adicional, la descripción proporciona una formulación oral de anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica. La formulación es un líquido o un polvo liofilizado.

55 La formulación liofilizada incluye una dosis unitaria de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y alrededor de 34 mg de trehalosa y 0,17 mg de metionina por mg de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

La formulación líquida incluye una dosis unitaria de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, 20 % de trehalosa (p/v) y 0,1 % de metionina (p/v).

60 Estas formulaciones orales pueden tener la forma de una cápsula, preferiblemente una cápsula con recubrimiento entérico.

## 65 **Definiciones**

- 65 A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto

requiera lo contrario, los términos en singular incluirán plurales, y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, y química de proteínas y oligonucleótidos o polinucleótidos e hibridación descritas aquí son aquellas bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe aquí. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritas aquí son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Se usan técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéuticas, y tratamiento de pacientes.

Como se utilizan según la presente descripción, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

Como se usa aquí, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente (inmunoreacciona con) un antígeno. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos polyclonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab'}$  y  $F_{(ab')2}$ , y una biblioteca de expresión de  $F_{ab}$ . Por "unirse específicamente" o "inmunorreaccionar con", se entiende que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigenicos del antígeno deseado, y no reacciona (es decir, no se une) con otros polipéptidos, o se une con una afinidad mucho menor ( $K_d > 10^{-6}$ ) con otros polipéptidos.

Se sabe que la unidad estructural básica del anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" (alrededor de 50-70 kDa). La porción amino terminal de cada cadena incluye una región variable de alrededor de 100 a 110 o más aminoácidos, principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxí terminal de cada cadena define una región constante, responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas se clasifican en cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgA, e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de alrededor de 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de alrededor de 10 aminoácidos más. Véase en general, Fundamental Immunology Cap. 7 (Paul, W., ea., 2<sup>a</sup> ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadenas ligeras/pesadas forman el sitio de unión al anticuerpo.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (MAb) o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa aquí, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie molecular de molécula de anticuerpo, que consiste en un producto genético de cadena ligera único y un producto genético de cadena pesada único. En particular, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los mAb contienen un sitio de unión al antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítopo particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única por él.

En general, las moléculas de anticuerpos obtenidas de seres humanos pertenecen a cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que se diferencian entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases también tienen subclases, tales como IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, y otras. Además, en seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

Como se usa aquí, el término "epítopo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina, un scFv, o un receptor de células T. El término "epítopo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de células T. Los determinantes epítópicos suelen consistir en agrupaciones superficiales de moléculas químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y suelen tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se afirma que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es  $\leq 1 \mu\text{M}$ ; preferiblemente  $\leq 100 \text{ nM}$ , y lo más preferible  $\leq 10 \text{ nM}$ .

Como se usan aquí, las expresiones "unión inmunológica" y "propiedades de unión inmunológica" y "unión específica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que ocurren entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el cual la inmunoglobulina es específica. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se puede expresar en términos de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción, en la que una  $K_d$  más pequeña representa una afinidad mayor. Las propiedades de unión inmunológica de polipéptidos seleccionados se cuantifican usando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de esos métodos implica medir las velocidades de formación y disociación del complejo de sitio de unión al antígeno/antígeno, en el que esas tasas dependen de las concentraciones de las parejas del complejo, la afinidad de la interacción, y los parámetros geométricos que influyen igualmente en la

5 velocidad en ambas direcciones. De este modo, tanto la "constante de velocidad directa" ( $K_{on}$ ) como la "constante de velocidad inversa" ( $K_{off}$ ) pueden determinarse mediante el cálculo de las concentraciones y las velocidades reales de asociación y disociación. (Véase *Nature* 361: 186-87 (1993)). La relación  $K_{off}/K_{on}$  permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación  $K_d$ . (Véase, en general, Davies et al. (1990) *Annual Rev Biochem* 59:439-473). Se afirma que un anticuerpo de la presente invención se une específicamente a un epítopo CD3 cuando la constante de unión en equilibrio ( $K_d$ ) es  $\leq 1 \mu\text{M}$ , preferiblemente  $\leq 100 \text{ nM}$ , más preferiblemente  $\leq 10 \text{ nM}$ , y lo más preferible  $\leq 100 \text{ pM}$  a alrededor de 1 pM, medida mediante ensayos tales como ensayos de unión de radioligandos o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica.

- 10 Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales de hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amidas es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspártico, y asparagina-glutamina.
- 15 20 Como se analiza aquí, se contempla que las variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina estén abarcadas por la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos 75 %, más preferiblemente al menos 80 %, 90 %, 95 %, y lo más preferible 99 %. En particular, se contemplan reemplazos conservativos de aminoácidos. Los reemplazos conservativos son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos genéticamente codificados generalmente se dividen en familias: (1) los aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) los aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) los aminoácidos no polares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, y (4) los aminoácidos polares no cargados son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. Los aminoácidos hidrófilos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia alifática-hidroxi; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano y tirosina, que son la familia aromática.
- 25 30 35 40 Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia alifática-hidroxi; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano y tirosina, que son la familia aromática.
- 45 El término "agente" se usa aquí para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto elaborado a partir de materiales biológicos.

El término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios.

- 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 La descripción también incluye fragmentos de anticuerpos anti-CD3  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}$  y  $F_{(ab')2}$ , anticuerpos anti-CD3 monocatenarios, anticuerpos anti-CD3 biespecíficos, anticuerpos anti-CD3 heteroconjugados, anticuerpos triespecíficos, inmunoconjugados y fragmentos de los mismos.

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para CD3. La segunda diana de unión es cualquier otro antígeno, y ventajosamente es una proteína de la superficie celular o un receptor o una subunidad del receptor.

#### EJEMPLO 1: DOSIFICACIÓN

- 50 Los datos del modelo animal indicaron que una dosis adecuada para una formulación oral anti-CD3 de la descripción es alrededor de 15 mcg/ratón de 20 g de peso corporal, o aproximadamente 750 mcg/kg para cada ratón. El factor de conversión de la dosis equivalente humana basada en la superficie corporal es 12,3. Así, la dosis equivalente humana asciende a 3,67 mg/60 kg de peso corporal. Los sujetos humanos recibirán entre 0,1 mg y 10 mg de anticuerpo anti-CD3.

55 Los datos con animales han demostrado que la dosis subcutánea debe ser al menos dos veces mayor que la dosis de la formulación oral anti-CD3. Por tanto, el intervalo de dosis para las formulaciones subcutáneas anti-CD3 de la descripción está en el intervalo de alrededor de 1 mg/60 kg de peso corporal a 60 kg de peso corporal.

#### EJEMPLO 2: MÉTODOS GENERALES PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA FORMA DE DOSIFICACIÓN DEL ANTICUERPO NI-0401/CD3 LIOFILIZADO PARA USO EN FORMULACIÓN ORAL

- 60 65 70 75 80 85 90 95 100 El objetivo de estos estudios fue desarrollar formulaciones de dosificación oral de NI0401. Específicamente, el objetivo de este estudio fue producir una forma farmacéutica liofilizada del anticuerpo NI-0401/CD3. La forma liofilizada de NI0401 será el ingrediente activo de una formulación oral en una cápsula.

Se desarrolló una formulación liofilizable mediante la selección de excipientes en busca de agentes de volumen y estabilizantes, seguido de una evaluación de la estabilidad en T0 y T14. Brevemente, la evaluación de la viabilidad se realizó como se resume

- 5      ◦ Iteración 1: Detección con agentes de volumen y análisis de estabilidad en T0 y T14: Se utilizaron agentes de volumen tales como trehalosa, sacarosa, manitol y lactosa.
- 10     ◦ Iteración 2: Detección con estabilizantes y análisis de estabilidad: se usaron estabilizantes tales como metionina, arginina, ascorbato de sodio y EDTA en combinación con un agente de volumen seleccionado, trehalosa, de la iteración#1.
- 15     ▪ Determinación de la temperatura de transición vítrea (Tg) usando MDSC en una formulación principal seleccionada de la iteración#2 (que contiene trehalosa como agente de volumen y estabilizantes metionina +/- EDTA).
- 20     ◦ Iteración 3: Liofilización de formulaciones principales, y análisis de estabilidad a corto plazo de 14 días en T0 y T14 (50 °C y 4 °C).

## 20     ***Materiales y métodos***

### Dialisis

25     La dialisis promueve el intercambio de amortiguador acuoso con la proteína de interés mediante difusión selectiva a través de una membrana semipermeable con un corte de peso molecular conocido. Las membranas usadas para esta técnica difieren en el tamaño de los poros.

30     Se tomó una alícuota de muestra de NI-0401 en acetato de sodio 25 mM/NaCl 125 mM/0,02 % p/v polisorbato en un casete de dialisis Slide-A-Lyzer® (3-12 ml con un corte de MW de 10.000). Después, la muestra se dializó frente a 0,5 litros del amortiguador que contenía acetato de sodio 25 mM/0,02 % p/v polisorbato sin cloruro de sodio, preequilibrado a 2-8 °C con los primeros 3 intercambios de amortiguador (en un intervalo de ~1 hora) con 500 ml de amortiguador, para la eliminación del cloruro de sodio de la muestra. Las muestras dializadas se recogieron del casete, y la concentración de la muestra de NI-0401 que se evaluó sin dilución mediante espectroscopía UV usando un espectrofotómetro Nano Drop basado en la extinción teórica de 1 mg/ml es 1,52 a A280 nm proporcionada por Tiziana.

### pH

40     El pH de la muestra de formulación de NI-0401 o del placebo se midió usando un pH-metro Thermo Scientific, Orion Star Modelo A 211, equipado con un microelectrodo Ross PerpHecT, Modelo 8220BNWP. Para la preparación de la disolución de amortiguador, se usó un electrodo triodo para medir el pH (Thermo Scientific, US Gel-filled Ultra Triode Electrodes). Los instrumentos se estandarizaron usando amortiguadores de pH 4, 7 y 10 antes de cada uso.

### A280

45     Para la verificación del método de A280, se evaluó mediante espectroscopía UV usando el sistema SpectraMax Plus 384 de Molecular Dynamics, equipado con SoftMAX Pro 6.4. Para el análisis de A280, se usaron cubetas de cuarzo estándar (Starna Cells) con una longitud de recorrido ajustada en 1 cm. Todos los pocillos de la placa de cuarzo de 96 pocillos se llenaron con 200 µl de agua, y se leyeron a 280 nm, 252 y 330 usando un control de agua estándar. Se usó un amortiguador de PBS 1X para todas las diluciones y como amortiguador blanco. La disolución madre de NI-0401 de 5,9 mg/ml se diluyó hasta 1,2 mg/ml usando PBS 1X en un tubo de 1,5 ml. Esta disolución madre se usó para preparar las siguientes diluciones de 1,0, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 y 0,1 mg/ml. Todas las diluciones se realizaron en tubos de microcentrifuga separados, y se mezclaron con vórtex durante un par de segundos. Cada dilución se realizó en 3 réplicas, excepto 1,0 mg/ml, que se realizó en 6 réplicas. La concentración diana para el análisis de la muestra se seleccionó en 1 mg/ml. La dilución con seis réplicas fue para obtener la intra e interprecisión al 100 % de la concentración diana. Las diluciones patrón se transfirieron a la placa de cuarzo de 96 pocillos, a razón de 200 µl cada una. La placa con las diluciones se analizó a longitudes de onda de 280 nm y 330 nm. El fondo a 330 nm se restó de A280, y después se analizaron los valores para determinar su linealidad, precisión y exactitud.

### SDS-PAGE

60     La pureza/estabilidad de NI-0401 se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras. Las muestras se analizaron en geles de Bis-Tris al 4-12 %. Las muestras para el análisis reductor se redujeron en presencia de beta-mercaptopetanol, y se separaron en geles de Bis-Tris al 4-12 %. El método se verificó analizando tres geles con tres cargas diferentes para establecer la precisión y linealidad en la estimación de la pureza de la proteína. La linealidad de cada gel se determinó utilizando el software Quantity One del densitómetro GS800.

**SEC-HPLC**

- 5 Se verificó durante tres días consecutivos un método de cromatografía de líquidos de alta resolución con exclusión por tamaño (SE-HPLC) para determinar la linealidad, exactitud y precisión. Tiziana proporcionó una muestra de NI-0401 a ~6,5 mg/ml (6,0+/-0,6 mg/ml), que se usó como patrón para la verificación del método.

**MDSC**

- 10 MDSC se usa para determinar y comparar la temperatura de transición vítrea (Tg) de formulaciones principales (líquido). MDSC mide la diferencia en el flujo de calor entre una muestra y una referencia inerte, ya que ambas están sujetas a un programa de temperatura lineal y sinusoidal simultáneo. El comportamiento térmico de las muestras en proceso se llevó a cabo con calorimetría diferencial de barrido.
- 15 Para el estudio de MDSC, a la muestra de proteína NI-0401 no dializada/dializada se le asignaron alícuotas de 2,5 mg por vial. Se cargaron 30 µl de formulaciones líquidas en bandejas T Zero, y se cerraron con tapas herméticas T Zero. Como referencia, se usó la bandeja TZero vacía cerrada con tapa hermética TZero. Las muestras se examinaron colocando 30 µl de la formulación principal en bandejas Tzero, y se sellaron herméticamente. Se usaron bandejas vacías como referencia. Las temperaturas de transición vítrea (Tg) y la temperatura eutéctica (Teu) se evaluaron 20 usando los parámetros del método que se enumeran a continuación.

Parámetros del método de MDSC usados para determinar Tg y Teu de NI0401

- 25 Modular +/- 1 °C cada 60 segundos
- 30 Isotermia durante 5 min
- 35 Rampa 1 °C/min a -60 °C
- 40 Marcar el final del ciclo 1
- 45 Isotermia durante 5 min
- 50 Rampa 1 °C/min a 25 °C
- 55 Marca el final del ciclo 1
- 60 Parámetros del método de MDSC usados para determinar los efectos del recocido sobre la Tg de NI-0401
- 65 Equilibrar a 25 °C
- 70 Modular +/- 1 °C cada 60 segundos
- 75 Isotermia durante 5 min
- 80 Rampa 1 °C/min a -60 °C
- 85 Isotermia durante 5 min
- 90 Rampa 1 °C/min hasta -22/24/26 °C
- 95 Isotermia durante 5 min
- 100 Rampa 1 °C/min a -60 °C
- 105 Isotermia durante 5 min
- 110 Rampa de 1 °C/min hasta 20 °C
- 115 Marcar el final del ciclo 1

**Karl-Fischer**

- 65 El contenido de humedad se determinó usando un coulómetro Mettler Toledo DL36 KF, con una estufa de secado Mettler Toledo DO305. El instrumento se calibró con un patrón de agua Hydranal para KF-Oven (Sigma, 34784, lote nº SZBD 226AV). Los viales con torta liofilizada se calentaron a 100 °C en la estufa de secado, y el vapor de agua

generado se tituló culombimétricamente en Hydranal (Sigma, 34836, lote nº SZBE 2830V). El vial con la torta liofilizada se calentó en el horno, el vapor de agua residual en la muestra se burbujeó en una vasija con una disolución de cátodo y ánodo, en la que el agua provocó la oxidación del dióxido de azufre por el yodo. La cantidad de yodo generada, y por tanto la cantidad de agua, se calculó a partir de la cantidad de electricidad que fluye durante la reacción. Dividiendo la cantidad de agua generada entre el peso de la torta liofilizada en la muestra, se calcula el contenido porcentual de agua.

#### Osmolalidad

- 5 Las mediciones de osmolalidad se realizaron usando un microosmómetro de punto de congelación, equipado con un muestreador Ease Eject™ de 20  $\mu$ l). Las unidades de medida son miliosmoles del soluto en 1 kg de disolvente puro, expresado como osmolalidad (mOsm/kg H<sub>2</sub>O). El instrumento se calibró con patrones de calibración de 50 mOsm/kg (3MA005) y 850 mOsm/kg (3MA085), y se verificó con una disolución de referencia de control Clinitrol® de 290 mOsm/kg (3MA029) antes del análisis. Las pruebas de muestra se realizaron según SOP: DV-02-023. La osmolalidad de las formulaciones de NI-0401 se midió mediante el método de depresión del punto de congelación.

#### Enfoque isoelectrónico en gel (IEF)

- 10 El pH de la formulación de NI-0401 es fundamental para su estabilidad y bioactividad. La carga neta en NI-0401 es cero en su punto isoelectrónico (PI), positiva a un pH por debajo del PI, y negativa a un pH por encima del PI. La solubilidad es más baja en el PI. La elección del pH se realiza no sólo por la solubilidad sino también por la estabilidad y la propiedad de unión. Por lo tanto, se debe escoger un pH de compromiso para una máxima solubilidad y estabilidad para el desarrollo de la formulación.
- 15 Las muestras de NI-0401 se prepararon en amortiguador de muestra de IEF (pH 3-10), y las muestras se cargaron sin calor directamente en un gel de bloque vertical de IEF (pH 3-10) junto con marcadores de gradiente de pH. Se prepararon los amortiguadores de funcionamiento del ánodo y del cátodo, y se ejecutaron las condiciones del gel (como se describe en el Manual de electroforesis en gel premoldeado Novex de Life Technologies #IM-1002). Los geles se procesaron a 100 V durante 1 hora, 200 V durante 1 hora, y 500 V durante 30 min. Después de hacer pasar el gel, el gel se fijó con ácido tricloroacético (TCA) al 12 % durante 30 minutos, y se lavó durante 2 horas con cambios de agua desionizada cada 30 minutos, para eliminar el TCA al 12 %. El gel se tiñó entonces simplemente con tinción azul.

#### Enfoque isoelectrónico capilar (cIEF)

- 20 Se usó un método de enfoque isoelectrónico capilar cIEF no calificado únicamente con fines de confirmación. El (cIEF) se realizó mediante el sistema de caracterización de proteínas Proteome PA-800 usando un capilar neutro. Se añadieron marcadores de pl 4,1, 5,5, 7,0, 9,5 y 10,0 a la muestra, para una calibración lineal de pl frente al tiempo. La muestra para análisis se preparó añadiendo 10  $\mu$ l de NI-0401 6 mg/ml a 240  $\mu$ l de una mezcla que contenía 200  $\mu$ l de gel de cIEF con 3 M de urea, 12,0  $\mu$ l de anfolitos portadores Pharmalyte 3-10, 20,0  $\mu$ l de estabilizante catódico, 2,0  $\mu$ l de estabilizante anódico, y 2,0  $\mu$ l de cada uno de los cinco marcadores pl. Los contenidos se mezclaron con vórtex durante 15 segundos, y se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 rpm antes del análisis.

#### Parámetros de liofilización: Iteración#1 y 2

- 25 Las formulaciones lio de NI-0401 se prepararon añadiendo a la muestra de proteína NI0401 diferentes agentes de volumen y estabilizantes. Después de añadir agentes de volumen y estabilizantes, se midió el pH de todas las formulaciones y amortiguadores, y el pH se ajustó a  $\sim$ 5,5  $\pm$  0,05. Para la liofilización de las formulaciones de las iteraciones 1 y 2, los viales con alícuotas de 2,5 mg de formulaciones se colocaron en el centro de la bandeja, y se liofilizaron usando los parámetros mostrados en la Tabla 1-2 en un liofilizador FTS Lyo Star II respectivamente. Despues de completar la liofilización, los viales se volvieron a llenar con nitrógeno a 600.000 mtorr, y se taparon. Los viales se retiraron del estante después de alcanzar la presión establecida. Los viales se sellaron rápidamente con tapas de engarce de aluminio, para evitar la contaminación del aire atmosférico y evitar la liberación de N<sub>2</sub> del vial. Todos los viales liofilizados se analizaron en T<sub>0</sub>, y los viales se incubaron a 50 °C para los análisis en T<sub>14</sub> (excepto la iteración#1, que fue durante 12 días). Las formulaciones líquidas correspondientes también se mantuvieron a 50 °C durante 14 días (excepto la iteración#1, que fue durante 12 días).

#### Parámetros de liofilización: Iteración#3

- 30 Las formulaciones liofilizadas (lio) principales de NI-0401 se prepararon mediante la muestra de proteína NI-0401 pH: 5,59 con 20 % de trehalosa como agente de volumen, y 0,1 % de metionina +/- 0,1 % EDTA como estabilizantes. La adición de 0,1 % de metionina (del lote 0,3M/4,44 %) no alteró el pH. Sin embargo, la adición de EDTA (de un lote de 0,5 M) cambió el pH de 5,59 a 5,9, que se ajustó a un pH de  $\sim$ 5,5 con HCl 1 N. La muestra de NI-0401 se distribuyó en alícuotas de  $\sim$ 2,5 mg por vial. Los placebos para formulaciones principales se prepararon sin muestra de NI-0401. Para la liofilización de formulaciones principales, los viales con formulaciones principales se colocan en el estante del medio junto con viales (20) llenos con  $\sim$ 400  $\mu$ l de cada amortiguador de placebo. El resto del espacio en los estantes

de liofilización se llenó con viales que contenían 1 ml de agua por vial. Se utilizó un vial de cada formulación y un vial de cada placebo para comprobar los perfiles de temperatura insertando una sonda de temperatura en el liofilizador.

#### **EJEMPLO 3: EVALUACIÓN DE VIABILIDAD DE LIOFILIZACIÓN DEL NI-0401**

- 5 La formulación actual de NI-0401 es ~6,0 mg/ml en amortiguador que contiene acetato de sodio 25 mM, pH 5,5, cloruro de sodio 125 mM y 0,02 % (p/v) de polisorbato 80. El objetivo era evaluar la liofilización del anticuerpo en la misma formulación. Desde entonces, la presencia de cloruro de sodio, un excipiente cristalino, siempre es una preocupación al liofilizar una proteína/anticuerpo, debido a su naturaleza inherente para absorber agua con el tiempo a menos que
- 10 se caliente durante la etapa de liofilización. Por lo tanto, la selección de excipientes implicó el examen de la formulación actual (formulación no dializada) tal como está, con adición de agente de volumen y estabilizantes, y también dializando cloruro de sodio fuera de la formulación (formulación dializada) y añadiendo después agente de volumen y estabilizantes.
- 15 Había dos conjuntos de formulaciones, formulaciones de NI-0401 no dializadas/dializadas. Para todas las iteraciones, se liofilizaron 2,5 mg. Para la formulación de NI-0401 dializada, la muestra de NI-0401 se dializó para eliminar la sal del amortiguador de formulación, lo que se hizo para eliminar el punto eutéctico durante el procedimiento de secado primario y para evitar la absorbancia de humedad atmosférica por parte de la formulación liofilizada de NI-0401. Las formulaciones se analizaron en T0 o T14.
- 20 Las formulaciones para determinar la estabilidad en T cero (T0) se analizaron inmediatamente después de la liofilización.
- 25 Las formulaciones para determinar la estabilidad a 14 días (T14) se incubaron a 50 °C.
- 30 A T0 y T14, las formulaciones se analizaron para determinar el aspecto de la torta, el tiempo de reconstitución, el aspecto de la muestra líquida, A280, pH, SDS-PAGE y SEC-HPLC.
- 35 La formulación con agentes de volumen/estabilizantes que mostraban la mayor estabilidad y los niveles más bajos de impurezas se identificó para la formulación principal según los datos de estabilidad.

#### **EJEMPLO 4: ITERACIÓN 1: CRIBADO CON AGENTES DE VOLUMEN**

##### ***Lista de formulaciones***

- 35 La liofilización de las formulaciones de NI-0401 se evaluó en el amortiguador de formulación actual que contiene acetato de sodio, pH 5,5, con y sin cloruro de sodio, con el objetivo de comprender el efecto de la sal cristalina sobre la estabilidad de la muestra de NI-0401 en T0 y T14. Por lo tanto, NI-0401 se dializó frente a amortiguador de acetato de sodio 25 mM con 0,02 % p/v de polisorbato sin cloruro de sodio.
- 40 Las formulaciones de NI-0401 no dializadas/dializadas con diferentes agentes de volumen (Tabla 4) en una concentración de 2,5 mg/vial se liofilizaron, y entonces se evaluaron el día cero (T0) y el día 12 (T12) a 50 °C para comprender la estabilidad de la formulación con el tiempo y la temperatura con respecto a la formulación de control, y los resultados de estabilidad en T0 y T14 se resumen en la Tabla 5-6.
- 45

##### ***Aspecto de la torta y tiempo de reconstitución***

- 50 Las formulaciones liofilizadas y líquidas se analizaron para determinar la estabilidad en T0 y T12 (incubadas a 50 °C durante T12 días). Después de la liofilización, el aspecto de la torta era amorfo para todas las formulaciones, excepto para las formulaciones lio de control no dializadas/dializadas (Tabla 5). Todas las formulaciones lio y líquidas eran transparentes, excepto las formulaciones lio que contenían manitol y lactosa, que eran turbias (Tablas 5 y 6).

##### ***A280***

- 55 Los datos indicaron que las concentraciones de proteína de las formulaciones de la iteración #1 oscilaron de ~5,4 a 6,1 mg/ml, sin diferencias significativas en la concentración de proteína en T0 o después de T12, excepto para la formulación de T12 que contiene manitol (Tablas 5 y 6), debido a la opalescencia de la formulación.

##### ***SEC-HPLC***

- 60 El análisis de SEC-HPLC con todas las formulaciones no mostró cambios en el RT del pico principal (alrededor de 12,4+-0,2), excepto para la formulación lio no dializada que contenía lactosa, que eluyó con un cambio en el RT de 11,9 minutos.
- 65 El análisis de SEC-HPLC con formulaciones en T0 lio y líquidas, no dializadas y dializadas, mostró que la respuesta del pico principal fue alrededor de 99 % de la respuesta total, lo que sugiere que no hay un impacto significativo sobre

la liofilización de las formulaciones. Entre las formulaciones liofilizadas en T0 y T12, la formulación de NI-0401 que contiene trehalosa y lactosa mostró la mayor pureza (con una recuperación de >99 % en la respuesta del pico principal, respectivamente). Sin embargo, la formulación que contenía lactosa desplazó el tiempo de retención del pico principal. Se observa una recuperación mínima del área total del pico en T12 para la formulación que contiene manitol (Tabla 5-6). Las formulaciones en T0 y T12 que contienen trehalosa mostraron menos % de impureza en comparación con otras formulaciones, incluida la formulación de control (Tablas 5 y 6). Todas las formulaciones líquidas son propensas a una mayor degradación a 50 °C, y muestran un mayor % de impureza en el punto de tiempo T12 en comparación con las formulaciones lio (Tablas 5 y 6).

10 **SDS-PAGE**

15 Los datos del análisis de gel de SDS-PAGE para el % de pureza de las formulaciones se presentan en la Tabla 16. Las formulaciones lio no dializadas/dializadas que contienen trehalosa mostraron niveles bajos de impurezas, con un % de pureza de >98,6 % y >97 % respectivamente en gel reducido y no reducido en T0 y T12 en comparación con las formulaciones de control. Las formulaciones lio de NI0401 no dializadas/dializadas que contienen lactosa mostraron un cambio en la movilidad de las proteínas en un gel reducido y no reducido. La formulación lio dializadas en T12 mostró más % de pureza en comparación con la formulación lio no dializada en un gel reducido y no reducido. Las formulaciones lio no dializadas/dializadas que contenían manitol en T0 y T12 mostraron una recuperación muy baja (80-87 % de recuperación), y mostraron un mayor % de impurezas en un gel no reducido, lo que es consistente con los datos de SEC-HPLC.

20 El análisis cuantitativo con análisis de SDS-PAGE con formulaciones líquidas usando el método de SDS-APGE de Tiziana mostró una mayor degradación de las formulaciones líquidas en T12 en comparación con las formulaciones líquidas en T0 en un gel no reducido. Otras formulaciones líquidas que contenían lactosa mostraron un cambio en la movilidad. La formulación líquida que contenía trehalosa mostró un mayor % de pureza en comparación con otras formulaciones.

25 En base a estos resultados, la formulación que contenía 10 % de trehalosa, con y sin diálisis, se seleccionó para la iteración #2 para su detección en combinación con diferentes estabilizantes.

30 El análisis de SEC mostró un alto % de pureza y un bajo % de impureza para las formulaciones en T0 y T12 que contienen trehalosa en comparación con otras formulaciones, incluida la formulación de control.

35 El análisis de SEC indicó que todas las formulaciones líquidas son propensas a una alta degradación de LMW, y muestran un alto % de impurezas cuando se mantienen a 50 °C durante 12 días (T12) en comparación con las formulaciones liofilizadas.

40 El análisis de SEC mostró que las formulaciones liofilizadas en T12 que contenían trehalosa y lactosa mostraron la mayor pureza. Sin embargo, la formulación que contenía lactosa desplazó el tiempo de retención del pico principal.

45 Con el análisis de geles reducidos y no reducidos para formulaciones no dializadas/dializadas, las formulaciones que contienen trehalosa y lactosa mostraron la mayor pureza de proteína con bajas impurezas. Las formulaciones en T12 mostraron mayores impurezas en comparación con las formulaciones en T0, de acuerdo con los datos de SEC-HPLC.

50 No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteína de las formulaciones ni en T0 ni después de T12, excepto para la formulación que contenía manitol en T12. La formulación liofilizada que contiene manitol mostró una baja solubilidad.

**EJEMPLO 4: ITERACIÓN 2: CRIBADO CON DIFERENTES ESTABILIZANTES**

55 La muestra de NI-0401 no dializada o dializada se liofilizó con estabilizantes con el objetivo de comprender el efecto de los estabilizantes sobre la estabilidad de la formulación de NI-0401 liofilizada usando 10 % de trehalosa como agente de volumen.

60 ***Lista de formulaciones***

65 Para la iteración#2, las formulaciones de NI-0401 no dializadas/dializadas con diferentes estabilizantes que usan 10 % de trehalosa como agente de volumen se resumen en la Tabla 7. Para el estudio de formulación, las muestras no dializadas/dializadas se dividieron en alícuotas a 2,5 mg/vial para formulaciones líquidas/de liofilización. Después de la liofilización, las formulaciones líquidas no dializadas/dializadas y lio se mantuvieron a 50 °C durante 14 (T14) días, o se analizaron inmediatamente en T0. La estabilidad de las formulaciones se analizó usando A280, SDS-PAGE y

SEC-HPLC, y los resultados se presentan a continuación. Las Tablas 8 y 9 muestran el resumen de los resultados del análisis de estabilidad con las formulaciones de la iteración#2.

**Aspecto de la torta y tiempo de reconstitución**

5 La Tabla 8 muestra el aspecto de la torta liofilizada en T0 y después de 14 días de incubación a 50 °C, que era amorfo para todas las formulaciones. El colapso de la torta fue mayor en las formulaciones no dializadas en comparación con las formulaciones dializadas (Tabla 8), y el colapso fue de casi el 80-90 % en las formulaciones no dializadas/dializadas que contenían arginina. La formulación dializada que contenía ascorbato de sodio también mostró un colapso del 80-90 % (Tabla 18).

10 15 El aspecto líquido de las formulaciones era transparente, excepto la formulación lio y líquida que contenía arginina y la formulación líquida que contenía ascorbato de sodio, que parecían turbias debido a la precipitación (Tablas 8 y 9). La formulación líquida que contenía ascorbato se volvió amarillenta debido a la oxidación del ácido ascórbico a ácido deshidroascórbico.

**A280**

20 25 No hubo cambios significativos en la recuperación de proteína entre las diferentes formulaciones lio/líquidas, excepto para la formulación liofilizada no dializada/dializada con 10 % de Tre-arginina (\*), que mostró variabilidad en la concentración de proteína debido a la precipitación/turbidez de la formulación. La formulación líquida y liofilizada no dializada/dializada que contenía 10 % de Tre-ascorbato sódico (\*#) mostró una concentración de proteína muy alta debido a la interferencia del ascorbato con el ensayo de A280 (Tabla 18-19).

**SEC-HPLC**

30 35 Los datos de SEC-HPLC con formulaciones lio y líquidas en T0 y T14, dializadas y no dializadas, mostraron que la respuesta del pico principal fue alrededor de 96-98 % (Tabla 8-9), lo que sugiere que no hay un impacto significativo sobre la liofilización de las formulaciones, excepto para la formulación con arginina. La respuesta del pico principal para la formulación que contenía arginina fue menor que 97 %, oscilando de 27 % a 97 % en T0 y 35-81 % en T14, respectivamente, debido a la precipitación de la proteína (Tabla 8-9). La ligera reducción en la respuesta total para las formulaciones con EDTA se debe a la baja concentración de proteína inyectada en la columna.

40 45 La formulación líquida y lio que contenía arginina también mostró el mayor % de impurezas. Las formulaciones que contienen metionina, ascorbato de Na y EDTA mostraron el menor % de impurezas totales (Tabla 8-9). Las formulaciones no dializadas/dializadas que contienen trehalosa o trehalosa-metionina no mostraron cambios significativos en el RT del pico principal. Sin embargo, el análisis de SEC-HPLC con formulaciones de NI-0401 dializadas que contienen arginina o EDTA en T0 y T14 mostró un cambio en el tiempo de retención de 0, 15-0,35 Como se esperaba, las formulaciones líquidas mostraron mayores impurezas en comparación con las formulaciones líquidas lio, y la recuperación fue de alrededor de 96-99 % (Tabla 8-9).

**SDS-PAGE**

50 55 Las formulaciones de la iteración#2 se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras para determinar la pureza de las formulaciones. Las imágenes y el análisis de cuantificación de todas las formulaciones con geles reducidos y no reducidos se presentan en la Tabla 10. Las formulaciones no dializadas/dializadas que contienen metionina y EDTA mostraron una pureza elevada y bajos niveles de impurezas (Tabla 10), mostrando una pureza de >99 % en gel no reducido y >95 % en gel reducido. Las formulaciones líquidas no dializadas/dializadas que contienen arginina y ascorbato de sodio en T14 mostraron una recuperación muy baja debido a la precipitación (Tabla 10), lo que está de acuerdo con los datos de SEC-HPLC.

60 65 El análisis cuantitativo con análisis de SDS-PAGE con formulaciones líquidas usando el método de SDS-PAGE de Tiziana mostró una mayor degradación de las formulaciones líquidas en T14 en comparación con las formulaciones líquidas en T0 en un gel no reducido. Otras formulaciones líquidas que contienen arginina mostraron mayores impurezas. La formulación líquida que contiene trehalosa con metionina/EDTA mostró un mayor % de pureza en comparación con otras formulaciones.

70 75 El análisis de SEC mostró un alto % de pureza y un bajo % de impureza para las formulaciones no dializadas en T0 y T14 que contienen 10 % de trehalosa con Met+/-EDTA en comparación con otras formulaciones. Las formulaciones en T0 y T14 que contienen 10 % de trehalosa con arginina mostraron la mayor impureza y la menor recuperación.

80 85 El análisis de SEC indicó que todas las formulaciones líquidas son propensas a una alta degradación de LMW, y muestran un alto % de impurezas cuando se mantienen a 50 °C durante 14 días (T14) en comparación con las formulaciones lio.

El análisis de SEC-HPLC con formulaciones de NI-0401 dializadas que contienen arginina o EDTA en T0 y T14 mostró un cambio en el tiempo de retención de 0,15-0,35.

- 5 Con análisis de geles reducidos y no reducidos en formulaciones no dializadas/dializadas, las formulaciones que contienen 10 % de trehalosa con Met+/-EDTA/ascorbato de sod. mostraron la mayor pureza de proteína con bajas impurezas. Todas las formulaciones líquidas mostraron altas impurezas en comparación con las formulaciones lio. Entre las formulaciones no dializadas/dializadas, las formulaciones que contienen arginina y ascorbato de sod. mostraron baja pureza/recuperación.
- 10 No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteína de las formulaciones ni en T0 ni después de T12, excepto para la formulación que contiene arginina en T0 y T12 y la formulación que contiene ascorbato de sod. a T14. La formulación que contiene ascorbato de sod. apareció amarilla en T14.
- 15 Con base en los datos de estabilidad de la iteración#2, la formulación sin diliazar que contenía 10 % de trehalosa y 0,1 % de Met con y sin EDTA se seleccionó para la iteración #2 para analizar la Tg usando análisis de MDSC.

**EJEMPLO 5: ANÁLISIS DE MDSC SOBRE FORMULACIONES PRINCIPALES A PARTIR DEL CRIBADO DE LA ITERACIÓN#2**

- 20 Según el análisis de estabilidad con las formulaciones de la iteración#2 en T0 y T14, la formulación principal para NI-0401 no dializado seleccionada fue 10 % de trehalosa con 0,1 % de metionina +/-EDTA. Se realizó una DSC modulada en formulaciones principales para determinar la temperatura de transición vítreo de la formulación con el fin de establecer la temperatura de secado primario de las formulaciones por debajo de la temperatura de transición vítreo (Tg) durante el procedimiento de liofilización.
- 25

***Lista de formulaciones***

- 30 Para el estudio de MDSC, se prepararon formulaciones líquidas y de liofilización de NI-0401 dializadas y no dializadas con diferentes estabilizantes usando 10 % o 20 % de trehalosa como agente de volumen, y la muestra se distribuyó en alícuotas de 2,5 mg por vial. Las formulaciones usadas para el estudio de MDSC se resumen en la Tabla 11, y el análisis de MDSC se realizó usando parámetros en 30 µl de formulaciones líquidas que se cargaron en bandejas T Zero y se engarzaron con tapas herméticas T Zero. Como referencia, se usó la bandeja T Zero vacía engarzada con tapa hermética T Zero.

35 ***Determinación de Tg en formulaciones principales***

- 40 MDSC se realizó en formulaciones principales no dializadas/dializadas y en la formulación actual para determinar los eventos térmicos, incluida la temperatura de transición vítreo (Tg). Los resultados del análisis de MDSC se resumen en la Tabla 12. Como se muestra en la Tabla 12, MDSC en la formulación actual mostró un punto eutéctico que se eliminó completamente por la presencia de 10 % de trehalosa que está presente en la formulación principal (no dializada/dializada) junto con 0,1 % de metionina. Sin embargo, la presencia de cloruro de sodio en la formulación no dializada redujo la temperatura de transición vítreo de -32 °C a -37 °C. Se encontró que la Tg de la formulación no dializada y dializada con 0,1 % de Met fue -36,88 °C y -31,87 °C respectivamente.

45 ***Determinación de Tg a diferentes temperaturas de recocido***

- 50 A continuación, la MDSC se realizó a diferentes temperaturas de recocido para la formulación principal no dializada. Como la temperatura de transición es -37 °C para la formulación principal, se intentó reducir la temperatura de transición vítreo, ya que es difícil mantener la temperatura del producto a o por debajo de la temperatura de colapso de -37 °C durante la etapa de liofilización del procedimiento de secado primario con un control de temperatura y presión. Y si la temperatura del estante es inferior a -37 °C, el tiempo total de liofilización será mayor y no será rentable. Como se muestra en la Tabla 12, MDSC en formulación principal (formulación no dializada con 10 % de trehalosa y 0,1 % de metionina) a diferentes temperaturas de recocido no mostró cambios importantes en la temperatura de transición vítreo (Tg de -37 °C) de la formulación principal no dializada.

55 ***Determinación de Tg en formulaciones principales con 10 % y 20 % de trehalosa***

- 60 El procedimiento de recocido a diferentes temperaturas no redujo la temperatura de transición vítreo; por lo tanto, la formulación que contenía mayor cantidad de trehalosa se evaluó para determinar si reducía la Tg. Además, el análisis de MDSC no indicó diferencias significativas entre la formulación que contenía 20 % de trehalosa y 0,1 % de EDTA y la formulación principal que contenía 10 % de trehalosa y 0,1 % de metionina. Además, no se observaron cambios en el tiempo de retención en el cromatograma (SEC-HPLC) entre las muestras de NI0401 no dializadas con 10 % de trehalosa/10 % de trehalosa-0,1 % de metionina/20 % de trehalosa + 0,1 % de EDTA. Como se muestra en la Tabla 12, MDSC en la formulación principal (formulación no dializada que contiene 0,1 % de metionina) con un aumento de trehalosa (del 10 % al 20 %) disminuyó la Tg en ~2 (°C), lo cual es deseable para el procedimiento de liofilización; por

tanto, esta formulación que contiene 20 % de trehalosa con 0,1 % de metionina +/- 0,1 % de EDTA se seleccionó para la iteración final en lugar de una formulación con 10 % de trehalosa.

5 La adición de 10 % de trehalosa como agente de volumen eliminó el punto eutéctico causado por la presencia de NaCl en la formulación principal no dializada que contenía 0,1 % de metionina.

El cambio en la temperatura de recocido no mostró efecto sobre la Tg de la formulación principal.

10 El aumento de la concentración de trehalosa de 10 % a 20 % disminuyó la Tg de la formulación principal que contiene 0,1 % de metionina de -36 °C a -34 °C, lo cual es deseable para el procedimiento de liofilización. La adición de EDTA a la formulación principal con 20 % de trehalosa no tuvo efecto sobre la Tg.

15 El análisis de MDSC en formulaciones que contienen 20 % de trehalosa y 0,1 % de Met con y sin EDTA mostró una Tg de ~-34,6 °C, que es deseable para el procedimiento de liofilización.

15 Formulaciones que contienen 20 % de trehalosa y 0,1 % de Met con y sin EDTA se seleccionaron como formulaciones principales para la iteración#3. (Tabla 13)

#### **EJEMPLO 6: ITERACIÓN#3 LIOFILIZACIÓN Y ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE FORMULACIONES PRINCIPALES**

20 Según el análisis de estabilidad y los resultados de MDSC de la iteración#2, la formulación de NI-0401 no dializada que contenía 20 % de trehalosa y 0,1 % de metionina se seleccionó para el ciclo de liofilización final y la evaluación de estabilidad a corto plazo en T0 y T14. El análisis incluyó contenido de humedad residual según Karl Fisher, aspecto, tiempo de reconstitución, A280, pureza mediante SEC-HPLC y SDS-Page, osmolalidad, % de contenido de humedad, IEF en gel y cIEF. Los resultados de la iteración#3 final se presentan a continuación, y el resumen de los datos del análisis de estabilidad se muestra en la Tabla 14.

##### ***Aspecto de la torta y tiempo de reconstitución***

30 Todas las formulaciones principales de la iteración#3 mostraron una torta intacta, excepto la formulación de control, que mostró relativamente más colapso. Todas las formulaciones se disolvieron en menos de 1 minuto, y todas las formulaciones eran transparentes, excepto la formulación de control a 50 °C, que era ligeramente turbia (se centrifugó y se usó en el análisis de estabilidad posterior).

##### ***pH***

40 El pH de diferentes formulaciones lio después de la reconstitución y antes de lio se muestra en la Tabla 14. Los datos indicaron que el valor de pH cambió de 5,5 a 5,9 para las formulaciones principales que contenían trehalosa, y de 5,5 a 7,6 para la formulación actual sin trehalosa. La razón de un cambio en el pH después de la liofilización podría deberse a la evaporación del ácido acético en la formulación actual durante el procedimiento de liofilización, que es más pronunciada para la formulación actual. La presencia de agentes de volumen y estabilizantes podría haber ayudado a estabilizar el pH en las formulaciones principales.

##### ***A280***

45 Las concentraciones de proteína de diferentes formulaciones se muestran en la Tabla 14. Se midió la concentración de proteína (mg/ml) de diferentes formulaciones, sin dilución, usando un espectrofotómetro Nano Drop, basándose en que la extinción teórica de 1 mg/ml es 1,52 a A280 nm, proporcionada por Tiziana. La ligera disminución en la concentración de proteína después de añadir 20 % de trehalosa se debe al aumento de volumen después de la adición de 20 % de trehalosa. Los datos no indicaron cambios significativos en las concentraciones de proteína después de la incubación de las formulaciones a 4° o 50 °C durante 14 días, excepto para la formulación actual a 50 °C debido a una ligera precipitación.

##### ***Contenido de humedad (%)***

55 El contenido de humedad de diferentes formulaciones principales junto con la formulación actual se determinó usando un coulómetro Mettler Toledo DL36 KF, y los resultados se muestran en la Tabla 14. El contenido de humedad de las formulaciones principales que contenían Met/Met+EDTA fue 3,34 % y 2,32 % respectivamente. No hubo cambios significativos en el contenido de humedad después de incubar las formulaciones durante 14 días tanto a 4 °C como a 50 °C.

##### ***Osmolalidad***

65 La osmolalidad de diferentes formulaciones lio después de la reconstitución se muestra en la Tabla 14. Los datos indicaron que la formulación principal que contiene trehalosa es hipertónica, y la formulación actual es isotónica como

se esperaba. No hubo cambios en la osmolalidad después de incubar las formulaciones durante 14 días a 4 °C y 50 °C.

#### SEC-HPLC

5 El % de respuesta del pico principal de las formulaciones de NI-0401, la respuesta del área total (AUC) junto con el % de impureza se evaluaron mediante análisis de SEC-HPLC, y los resultados se presentan en la Figura 5-9 y la Tabla 14). La respuesta del área principal (AUC y %) para todas las formulaciones con NI-0401 se presenta en la Figura 5. 10 En los datos generales con formulaciones principales lio en T0 y T14, la respuesta del pico principal fue alrededor de 99,90 % de la respuesta del pico total (Figura 5), lo que sugiere que no hay un impacto significativo sobre la liofilización de las formulaciones principales. Sin embargo, las formulaciones de control mantenidas a 50 °C/4 °C mostraron una 15 respuesta del pico principal más baja, 82 % y 98 % respectivamente (Figura 5). La reducción en el % de recuperación del pico principal de la formulación de control en T14 (50 °C) se debe a la ligera turbidez/precipitación de la muestra. Los picos observados entre tiempos de retención de 15 a 17 minutos se deben a los componentes presentes en el amortiguador/formulaciones, tales como sal/metionina/EDTA.

Los cromatogramas para todas las formulaciones en T14 no mostraron cambios significativos en el RT del pico principal mantenidas a 50 °C y 4 °C.

20 La adición aumento de formulaciones con trehalosa dio como resultado una ligera reducción en la concentración, por lo tanto una menor respuesta en la respuesta del pico principal y en la respuesta total para formulaciones con trehalosa y Met/Met+EDTA en T0/T14 (4 °C) (Figura 6). Las formulaciones que contienen metionina/Met+EDTA mostraron el menor % de impurezas totales (Figura 7) en comparación con la formulación de control. La formulación de control en T14 a 50 °C mostró niveles más altos de impurezas en comparación con la formulación de control en T14 mantenida a 4 °C (Figura 7). El % de recuperación del pico total o el % de recuperación del pico principal de las formulaciones en T14, en comparación con las formulaciones en T0, no se ve afectado (Figura 8-9).

#### SDS-PAGE

30 Las formulaciones lio principales en T0 y T14 que contienen trehalosa y metionina/trehalosa, metionina y EDTA, mantenidas a 50 °C/4 °C, mostraron una mayor pureza en comparación con la formulación de control (Tabla 15-16; Figura 10-11) en un gel no reducido y reducido, con un porcentaje de pureza de más de 99,3% y 98,5 % respectivamente. La formulación de control en T14 a 50 °C mostró niveles más altos de impurezas en comparación con la formulación de control en T14 mantenida a 4 °C (Tabla 15-16; Figura 10-11). No se observaron cambios 35 significativos en el % de pureza de las formulaciones principales en gel reducido y no reducido en T0 y T14 (Tabla 15-16; Figura 10-11).

#### Análisis de gel de IEF

40 Se realizó una prueba para el análisis de geles de IEF en la muestra de NI-0401 para conocer cualitativamente el pl de la muestra usando un método no verificado. Como se muestra en la Figura 12, se cargaron y analizaron en gel de IEF diferentes concentraciones de formulaciones de control en T14 lio (50 °C) y estándar de referencia de NI-0401. Se observa el enfoque de la muestra cerca del pocillo, lo cual se debe al alto pl de la muestra, que muestra el pl 45 aproximado de la muestra como >9,0, ya que los marcadores de pl por encima de 9,5 no se resolvieron completamente en el gel.

Dado que el análisis del gel de IEF con la formulación de control y el estándar de referencia de NI0401 muestra que el pl de la muestra de NI0401 es demasiado alto (pl>9) para separarse en el gel de IEF ya que la muestra se retiene cerca del pocillo, no se hicieron análisis adicionales para el IEF en gel sobre otras formulaciones principales. En 50 resumen, el análisis del gel de IEF con la formulación de control de NI-0401 muestra que el pl de la muestra de NI0401 es alrededor de -9,25.

#### Análisis de cIEF

55 Las formulaciones principales en T0 y T14 se analizaron mediante cIEF, para comprender la heterogeneidad de las formulaciones de NI0410. Para confirmar cualitativamente el pl de NI-0401, se utilizó cIEF, y a continuación se muestra un perfil típico de NI0401 (Figura 13), con una población heterogénea de la muestra de formulación actual de NI-0401 que muestra picos básicos (pl entre >9,27-9,45), picos ácidos (en comparación con el pl del pico principal entre <9,3-8,60), y la población del pico principal (pl entre -9,25-9,37). Los datos se analizaron en función del pl de la población 60 de picos ácido, básico y principal de la muestra de NI-0401 en diferentes formulaciones. La isoeléctrica capilar revela que no hay diferencias significativas en el pl de la población del pico principal, de picos básicos y de picos ácidos relativos en comparación con el pico principal de NI-0401 entre las formulaciones principales después de mantener las formulaciones a 4 °C o 50 °C durante 14 días. Sin embargo, en la formulación de control o actual en T14-50 °C, la 65 relación del pico principal disminuye y la relación de picos ácidos relativos aumenta, lo que sugiere desamidación (Figura 15). Este aumento en la desamidación en la formulación de control/actual puede deberse al aumento en el pH (de ~5,5 a 7,5) de la formulación después de la liofilización.

### **Conclusiones**

- 5 Los estudios de análisis de las formulaciones principales confirman la estabilidad de ambas formulaciones principales, es decir, NI-0401 en amortiguador de acetato de sodio 25 mM, pH 5,5, cloruro de sodio 125 mM, 0,02 % (p/v) de polisorbato 80, 20 % de trehalosa, 0,1 % de metionina; y NI-0401 en amortiguador de acetato de sodio 25 mM, pH 5,5, cloruro de sodio 125 mM, 0,02 % (p/v) de polisorbato 80, 20 % de trehalosa, 0,1 % de metionina, 0,1 % de EDTA.
- 10 El análisis de SEC mostró un alto % de pureza y un bajo % de impureza para las formulaciones principales que contienen 10 % de trehalosa con Met+/-EDTA en T0 y T14 en comparación con las formulaciones actuales. El % de recuperación del pico principal de las formulaciones principales fue >97 % en comparación con la formulación de control en T0 y T14.
- 15 El análisis de gel no reducido y reducido en formulaciones principales mostró que la formulación que contenía 10 % de trehalosa con Met+/-EDTA tenía la pureza de proteína más alta. La formulación de control mostró más % de impurezas.
- 20 No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteína de las formulaciones ni en T0 ni después de T14, excepto para la formulación actual en T14 50 °C.
- 25 El pH de la formulación actual cambió de 5,5 a 7,5, el pH de las formulaciones principales cambió de 5,5 a 5,9.
- 30 No se observaron cambios en la osmolaridad ni en el % del contenido de humedad en T0 y T14 con todas las formulaciones.
- 35 El análisis de gel de IEF para la formulación de control de NI0401 (T0-Lio) mostró un pl de >9,25, y la muestra se retuvo cerca del pocillo de gel sin una separación clara.
- 40 El análisis de cIEF no mostró diferencias significativas entre el pl de las poblaciones del pico principal, del pico básico y ácido relativo de la muestra de NI-0401 en formulaciones principales en T0 y T14.
- 45 El análisis de cIEF mostró un cambio en la formulación actual de NI-0401 en T14-50C, en el que la relación del pico principal disminuye y la relación relativa del pico ácido aumenta, lo que sugiere desamidación de la formulación de control en T14-50C.

### **Sumario**

- 40 Según los datos acumulados del cribado de excipientes con agentes de volumen y estabilizantes, y de los perfiles de estabilidad, las formulaciones principales finales para desarrollar la dosis de liofilización oral para el anticuerpo NI-0401/CD3 son:

- 45 NI-0401 en amortiguador de acetato de sodio 25 mM, pH 5,5, cloruro de sodio 125 mM, 0,02 % (p/v) de polisorbato 80, que contiene 20 % de trehalosa, 0,1 % de metionina, y NI-0401 en amortiguador de acetato de sodio 25 mM, pH 5,5, cloruro de sodio 125 mM, 0,02 % (p/v) de polisorbato 80, que contiene 20 % de trehalosa, 0,1 % de metionina y 0,1 % de EDTA.

### **EJEMPLO 7: EVALUACIÓN DE LA FORMULACIÓN ANTI-CD3 EN EL TRATAMIENTO A CORTO PLAZO DE LA CIRROSIS BILIAR PRIMARIA (CBP) Y EN EL TRATAMIENTO A LARGO PLAZO DE LA ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA (NASH).**

- 50 Los estudios presentados aquí están diseñados para evaluar el uso de una formulación anti-CD3 en el tratamiento a corto plazo de la cirrosis biliar primaria (CBP) y en el tratamiento a largo plazo de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
- 55 En estos estudios, se administrará una formulación anti-CD3 por vía oral, una vez al día durante 7 días, seguido de un ciclo repetido de descanso farmacológico. El estudio incluirá 21 pacientes, 7 de los cuales recibirán un placebo, y 14 de los cuales recibirán la formulación oral de anticuerpo anti-CD3 en una dosis de 5 mg/día. En estos estudios, los voluntarios sanos recibirán las siguientes dosis: 0,5 mg, 1,0 mg, 2,5 mg, 5 mg, 10 mg una vez al día durante 7 días, para determinar la dosis segura. El régimen de dosificación continuará durante 8 a 12 semanas, con el siguiente análisis intermedio de biomarcadores inmunológicos y/o criterios de valoración clínicos para CBP. El régimen de dosificación continuará con ciclos repetidos de dosificación ON y OFF. En estos estudios, la formulación oral de anticuerpo anti-CD3 se puede combinar con adyuvantes o ATRA o agente antiinflamatorio u otro segundo agente adecuado. En los estudios, el ácido obeticólico se puede administrar por separado del anticuerpo anti-CD3 oral.

**Tabla 1: Parámetros de temperatura y presión de liofilización para formulaciones de iteración# 1**

Etapa	Temperatura	Rampa de temperatura (°C/min)	Espera en horas	Presión
Carga	Ambiente	N/A	N/A	NA
Congelación	-50 °C	1 °C/min.	2	NA
Secado primario	-30 °C	1 °C/minuto	11,8	75 mTorr
Secado	+20 °C	1 °C/minuto	5,6	75 mTorr
Secundario				

**Tabla 2: Parámetros de temperatura y presión de liofilización para formulaciones de iteración# 2**

Etapa	Temperatura	Rampa de temperatura (°C/min)	Espera en horas	Presión
Carga	Ambiente	N/A	N/A	NA
Congelación	-50 °C	1 °C/min.	2	NA
Secado primario	-30 °C	1 °C/minuto	15	75 mTorr
Secado secundario	+20 °C	1 °C/minuto	5,0	75 mTorr

5 **Tabla 3: Parámetros de temperatura y presión de liofilización para formulaciones de iteración# 3**

Etapa	Temperatura	Rampa de temperatura (°C/min)	Espera en horas	Presión
Carga	Ambiente	N/A	N/A	NA
Congelación	-50 °C	1 °C/min.	4	NA
Secado primario	-32 °C	1 °C/min	60 h	70 mTorr
Secado secundario	+20 °C	1 °C/minuto	8 h	70 mTorr

**Tabla 4: Evaluación de viabilidad de la liofilización de NI-0401 no dializado/dializado: Formulaciones con agentes de volumen**

10

Formulación #	Tipo de formulación	Hidratos carbono/agentes volumen	Abreviaturas de de
1	<b>NI-0401 no dializado</b>	Control (ninguno)	No dial-líquida/lio-ninguno
2	en acetato de sodio 25 mM/NaCl 125 mM/0,02 % p/v polisorbato	10 % Trehalosa	No dial-líquida/lio-Tre
3		10 % Sacarosa	No dial-líquida/lio-Sac
4		5 % Manitol	No dial-líquida/lio-Man
5		5 % Lactosa	No dial-líquida/lio-Lac
6	<b>NI-0401 dializado</b>	Control (ninguno)	Dial-líquida/lio-ninguno
7	en acetato de sodio 25 mM/0,02 % p/v polisorbato	10 % Trehalosa	Dial-líquida/lio-Tre
8		10 % Sacarosa	Dial-líquida/lio-Suc
9		5 % Manitol	Dial-líquida/lio-Man
10		5 % Lactosa	Dial-líquida/lio-Lac

Tabla 5: Efecto de los agentes de volumen sobre la estabilidad de las formulaciones líquidas de Ni-0491 en T0 y T12: Aspecto de la torta, tiempo de reconsitución.

Relación #1 Resultados de estabilidad de formulaciones #6											
Punto de tiempo		T0-L6		T12-L6		T24-L6		T48-L6		T72-L6	
Nº de formulación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tipo de formulación	Niegan	10 % Ti	10 % Sa	5 % Alac	5 % Alac	Niegan	10 % Ti	10 % Sa	5 % Alac	5 % Alac	5 % Alac
Aspecto	No dañ	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
de la	crisal	crisal	crisal	crisal	crisal	crisal	crisal	crisal	crisal	crisal	crisal
carca	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
% de	No dañ	10	5	5	5	20	10	5	5	5	20
colapso	Dial	30	5	5	5	20	30	5	5	5	20
Tiempo	No dañ	5	75	45	50	45	10	15	185	pacial	25
de	reconsit	ución	Dial	5	35	80	75	75	25	185	165
Aspecto	No dañ	ts trasl	transp	transp	transp	turbio	transp	transp	transp	transp	transp
de	líquido	reente	reente	reente	reente	turbio	transp	transp	transp	transp	transp
Conec	No dañ	5.9	5.62	5.5	5.7	5.63	6.1	5.62	5.34	4.4*	5.45
(mg/ml)	Dial	5.98	5.47	5.5	5.88	5.8	6.12	5.46	5.82	5.81	5.78
SEC-	N	96.1	99.9	99.9	99.4	99.6	94.64	99.67	98.84	72.24	93.01
HPLC	o	Pure	o	Pure	o	Pure	o	Pure	o	Pure	o
al	0.93	0.1	0.2	0.6	0.8	5.36	0.33	1.16	27.76	0.99	0.65
Impur	el	92.1	99.5	99.7	98.47	99.6	82.76	95.47	75.3	82.45	92.35
el	Pure	0.8	0.5	0.3	0.53	0.4	77.24	0.33	74.1	17.55	0.65
Impur	ez	0.8	0.5	0.3	0.53	0.4	77.24	0.33	74.1	17.55	0.65

La formulación con marco más sólido quedó después de la licitación.

Tabla 6: Efecto de los agentes de volumen sobre la estabilidad de las formulaciones líquidas de Ni-0401 en T0 y T12: aspecto de la torta, tiempo de reconstitución de la torta, A280 y SEC-HPLC

Punto de tiempo: T0 Líquido		T12 líquida				
Nº de formulación:	1	2	3	4	5	6
Tipo de Nigrom:	10 % Fre	10 % Sa	5 % Mar	5 % Lac	Ningun	10 % Fre
aspas:	transpar	transpar	transpar	transpar	transpar	transpar
No. círculo:	ente	ente	ente	ente	ente	ente
del Dalt:	transpar	transpar	transpar	transpar	transpar	transpar
aguado:	ente	ente	ente	ente	ente	ente
Con:	5,74	5,59	5,56	5,87	5,77	5,14
G. Chat:	5,5	5,51	5,52	5,8	5,78	6,1
mg/ml:						
SEC N % de:	99,7	99,7	99,88	98,7	99,88	96,96
Cópatez:						
HPLC:						
C. al % de 0,3:	0,3	0,32	0,3	0,32	3,04	3,612
Impur. etza:						
D. % de 99,57:	99,57	99,59	99,68	99,69	91,25	91,03
al Igurez:						
% de 0,43:	0,43	0,43	0,41	0,32	0,34	8,73
Impur. etza:						

**Tabla 7: Formulaciones de la iteración#2: Cribado con Estabilizantes.**

Formulación #	Tipo de formulación	agente de volumen	Estabilizantes	Abreviaturas
1	<b>NI-0401 no dializado</b>	10 % Trehalosa	Ninguno	No dial-liq/lio Tre-ninguno
2		10 % Trehalosa	0,1 % Metionina	No dial-liq/lio Tre-Met
3	en acetato de sodio 25 mM/NaCl 125 mM/0,02 % p/v polisorbato	10 % Trehalosa	5 % arginina	No dial-liq/lio Tre-Arg
4		10 % Trehalosa	1 % Ascorbato de sod.	No dial-liq/lio Tre-Asc. Sod.
5		20 % Trehalosa	0,1 % EDTA	No dial-liq/lio Tre-EDTA
6	<b>NI-0401 dializado</b>	10 % Trehalosa	Ninguno	Dial-liq/lio-Tre-ninguno
7		10 % Trehalosa	0,1 % Metionina	Dial-liq/lio-Tre-Met
8	en acetato de sodio 25 mM/0,02 % p/v polisorbato	10 % Trehalosa	5 % arginina	Dial-liq/lio-Tre-Arg
9		10 % Trehalosa	1 % Ascorbato de sod.	Dial-liq/lio-Tre-Asc. Sod.
10		20 % Trehalosa	0,1 % EDTA	Dial-liq/lio-EDTA

Tabla 8: Efecto de los estabilizantes en formulaciones Iio de Ni-0401 en T0 y T14: aspecto de la torta, tiempo de reconstitución de la torta, A280 y SEC.

Tabla 9: Efecto de los agentes de carga sobre la estabilidad de las formulaciones líquidas de NI-0401 en T0 y T12: aspecto de la torta, tiempo de reconstitución de la torta, A280 y SEC-HPLC

Reacción #2 Resultados de estabilidad de formulaciones líquidas		T14 líquida				
Punto de tiempo	T0 Líquida	1	2	3	4	5
Nº de formulación:						
Tipo de formulación:	Tre-Met	Tre-Asc.	Tre-EDTA	Tre-Ninguno	Tre-Met	Tre-Arg.
Conc. No diaz	5,3	2,3*	37,9#)	4,6	5,6	5,4
Conc. Diaz (mg/ml)	6,4	5,3	4,2*	33,8#)	4,4	5,6
Aspe. No diaz	Transpar. edete	Transpar. ionio*	Transpar. seco	Transpar. seco	Transpar. seco	Transpar. seco
Aspe. Diaz	Transpar. edete	Transpar. Turbo	Transpar. Turbo	Transpar. Turbo	Transpar. Turbo	Transpar. Turbo
SEC. HPLC	99,37	99,49	95,5	100	98,13	96,1
SEC. C. 50% de impar	99,53	0,51	14,5	0	0,87	3,9
SEC. C. 50% de pura	99,53	99,53	99,9	100	98,2	97,7
% de D. impar	0,31	3,1	0	0,8	2,22	1,22
% de D. impar	0,31	3,1	0	0,8	2,22	1,22

\* La formulación presenta: # El Asc. Soc. interfirió con el ensayo de A280.

**Tabla 10: % de pureza e impureza de formulaciones lio no dializadas/dializadas en T0 y T14 en un gel no reductor y un gel reductor**

Formulaciones			Gel no reducido				Gel reducido			
			T0		T14		T0		T14	
			% de impureza	% de pureza	% de impureza	% de pureza	% de impureza	% de pureza	% de impureza	% de pureza
Formulación dializada	Lio No	Tre-ninguno	0,08	99,92	0,04	99,96	4,75	95,25	4,28	95,72
		Tre-Metionina	0,01	99,99	0,03	99,97	4,29	95,71	4,18	95,82
		Tre-Arginina	5,97	94,03	0,55	99,45	10,41	89,59	5,63	94,37
		Tre-Asc. Sod.	0,19	99,81	1,09	98,91	3,42	96,58	7,29	92,71
		Tre-EDTA	0,07	99,93	0,27	99,73	3,74	96,26	3,76	96,24
Formulación Dializada	Lio	Tre-ninguno	0,87	99,13	1,40	98,60	3,09	96,91	3,28	96,72
		Tre-Metionina	0,84	99,16	0,68	99,32	3,10	96,90	3,26	96,74
		Tre-Arginina	4,82	95,18	5,10	94,90	5,64	94,36	5,82	94,18
		Tre-Asc. Sod.	4,30	95,70	3,49	96,51	2,26	97,74	2,53	97,47
		Tre-EDTA	0,48	99,42	0,80	99,20	1,85	98,15	2,01	97,99

**5 Tabla 11: Iteración #2: Formulaciones de NI-0401 principales para análisis de MDSC.**

Formulación #	Tipo de formulación	Agente de volumen	Estabilizantes	Abreviaturas
1	<b>NI-0401 No dializado</b>	Ninguno	Ninguno	No dializada-Ninguno (Control)
2	en acetato de sodio 25 mM/NaCl 125 mM/0,02 % p/v polisorbato	10 % Trehalosa	0,1 % Metionina	No dial -Tre-Met (formulación principal)
3	<b>NI-0401 dializado</b> en acetato de sodio 25 mM/0,02 % p/v polisorbato	10 % Trehalosa	0,1 % Metionina	Dial -liq Tre-Met (formulación principal)
4	<b>NI-0401 no dializado</b>	20 % Trehalosa	0,1 % Metionina	No dial -20 % Tre-Met
5	en acetato de sodio 25 mM/NaCl 125 mM/0,02 % p/v polisorbato	20 % Trehalosa	0,1 % EDTA	No dial -20 % Tre-EDTA
6		20 % Trehalosa	0,1 % Metionina+ 0,1 % EDTA	No dial -20 % Tre-Met-EDTA

**10 Tabla 12: Temperatura de congelación, temperatura de fusión y temperatura de transición vítrea de formulación (tg) de la formulación principal dializada/no dializada y la formulación actual.**

Formulaciones líquidas	Resultados de MDSC de formulaciones líquidas				
	Temp. de recocido (°C)	Temp. de congelación (°C)	Temp. de fusión (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	Punto eutéctico (°C)
Formulación actual no dializada (Control)	N/A	-11,01	-1,02	-	-24,67
Formulación principal de NI0401 no dializada; 10 % Trehalosa; 0,1 % Metionina (No dial-Principal)	N/A	-14,13	-1,52	-36,88	-

Resultados de MDSC de formulaciones líquidas					
Formulaciones líquidas	Temp. de recocido (°C)	Temp. de congelación (°C)	Temp. de fusión (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	Punto eutéctico (°C)
NI0401 dializado; 10 % trehalosa; 0,1 % metionina (Dial-principal)	N/A	-8,06	-0,49	-31,87	-
	-22	-10,08	1,78	-36,87	-
Formulación principal de NI0401 no dializada; 10 % Trehalosa; 0,1 % Metionina (No dial-Principal)	-24	-14,85	1,79	-37,65	-
	-26	-15,26	1,95	-37,44	-
Formulación principal de NI0401 no dializada; 10 % Trehalosa; 0,1 % Metionina (No dial-Principal-10 % Tre+Met)	N/A	-14,13	-1,52	-36,87	-
Formulación principal de NI0401 no dializada; 20 % Trehalosa; 0,1 % Metionina (No dial-Principal-20 % Tre+Met)	N/A	-12,49	-2,60	-34,69	-
Formulación principal de NI0401 no dializada; 20 % Trehalosa; 0,1 % EDTA (No dial-Principal-20 % Tre+EDTA)	N/A	-9,17	-2,68	-34,69	-
Formulación principal de NI0401 no dializada 20 % trehalosa 0,1 % metionina y 0,1 % EDTA (No dial-Principal-20 % Tre+Met+EDTA)	N/A	-13,11	-2,50	-34,66	-

Tabla 13: Iteración#3 Formulaciones principales de NI-0401.

Formulaciones Lio con NI-0401				
Formulación #	Muestra	Agente de volumen	Estabilizantes	Abreviatura
1	NI-0401 en acetato de sodio 25 mM/NaCl 125 mM/0,02 % p/v de polisorbato	Ninguno	Ninguno	<b>Control</b>
2		20 % Trehalosa	0,1 % Metionina	20 % Tre-Met (formulación de Met)
3		20 % Trehalosa	0,1 % Metionina+0,1 % EDTA	20 % Tre-Met-EDTA (formulación de Met+EDTA)

Tabla 14: Iteración #3 formulaciones lio: resumen de los resultados de estabilidad

Iteración #3 Resultados de estabilidad de formulaciones lio									
Punto de T0 Lio		T14-50 °C Lio			T14-4 °C Lio				
Nº de formulación:	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tipo de formulación	Control	Tre-Met	Tre-EDTA	Cantrol	Tre-Met	Tre-EDTA	Cantrol	Tre-Met	Tre-EDTA
Aspecto de la torta	Blanco; cristalino	Blanco; amorfio	Blanco; amorfio						
% de colapso	5-40 %	5-10 %	5-10 %	50-60 %	10-20 %	10-20 %	40-60 %	10-20 %	10-20 %
Tiempo de reconstitución (s)	45	45	45	5	40	40	5	40	40
Aspecto de la disolución	transparente	transparente	turbio	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente
pH	7,14	5,8	5,72	7,57	5,9	5,81	7,14	5,8	5,72
Cone. (mg/ml)	6,1	5,5	5,4	6*	5,7	5,6	6,2	6,3	5,4
% de humedad	10,88*	3,34	2,32	7,41	3,04	2,88	N/A	N/A	N/A
Osmolaridad (mOsm/kg)	289	846	855	284	900	907	281	835	852
SEC % de pureza	98,85	98,98	99,9	62,07	98,09	98,42	98,56	99,58	99,46
HPLC % de impureza	1,15	0,02	0,1	17,93	0,9	0,57	1,55	0,42	0,52

Tabla 15: % de pureza e impureza de formulaciones principales lio en T0 y T14 en un gel no reductor.

Formulaciones lio	Gel no reducido					
	T0		T14-50 °C		T14-4 °C	
	%	%	%	%	%	%
	pureza	impureza	pureza	impureza	pureza	impureza
Control-ninguno	98,3	1,7	85,2	12,3	98,3	1,7
20 % Tre+0,1 % Met	99,4	0,6	99,4	0,6	99,4	0,6
20 % Tre+0,1 % Met+0,1 % EDTA	99,4	0,6	99,3	0,7	99,7	0,3

5

Tabla 16: % de pureza e impureza de formulaciones principales lio en T0 y T14 en un gel reductor.

Formulaciones lio	Gel reducido					
	T0		T14-50 °C		T14-4 °C	
	%	%	%	%	%	%
	pureza	impureza	pureza	impureza	pureza	impureza
Control-ninguno	98,3	1,7	95,7	4,3	98,5	1,5
20 % Tre+0,1 % Met	98,5	1,5	98,5	1,5	98,9	1,1
20 % Tre+0,1 % Met+0,1 % EDTA	99,0	1,0	99,5	0,5	99,6	0,4

## REIVINDICACIONES

1. Una formulación oral que comprende: anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, acetato de sodio trihidrato, cloruro de sodio, polisorbato 80, trehalosa, y metionina;
- 5 en la que el anticuerpo anti-CD3 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y  
la formulación es un líquido, y en la que la concentración de:
  - a. el acetato de sodio trihidrato es 10 mM a 500 mM;
  - 10 b. el cloruro de sodio es 10 mM a 500 mM;
  - c. el polisorbato 80 es 0,01 % a 1 % (p/v);
  - d. la trehalosa es 5 % a 25 % (p/v); y
  - e. la metionina es 0,1 % a 0,5 % (p/v).
- 15 2. La formulación oral de la reivindicación 1, que comprende además EDTA.
3. La formulación oral de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una dosis unitaria del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno,  
en la que la dosis unitaria es 0,1 mg a 10 mg, u  
20 opcionalmente en la que la dosis unitaria es 0,5 mg, 2,5 mg o 5,0 mg.
4. La formulación oral de la reivindicación 1, en la que la formulación comprende además EDTA en una concentración de 0,01 % a 1 % (p/v), o  
en la que la disolución está a un pH en el intervalo de 4 a 6.
- 25 5. La formulación oral de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la formulación oral comprende una dosis unitaria de 0,1 mg a 10 mg del anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión al antígeno del mismo, acetato de sodio trihidrato 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, 0,02 % de polisorbato 80 (p/v), 20 % de trehalosa (p/v), y 0,1 % de metionina (p/v), que comprende además opcionalmente 0,1 % de EDTA (p/v).
- 30 6. La formulación oral de la reivindicación 5, en la que la dosis unitaria es 0,5 mg, 2,5 mg o 5,0 mg.
7. Una formulación oral que comprende: anticuerpo anti-CD3 o fragmento de antígeno del mismo, acetato de sodio trihidrato, cloruro de sodio, polisorbato 80, trehalosa, y metionina; en la que el anticuerpo anti-CD3 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, en la que la formulación es un polvo liofilizado, y en la que la relación de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno a:
  - a. polisorbato 80 es 1: 0,01 a 0,1 (p/p);
  - b. trehalosa es 1: 10 a 50 (p/p);
  - c. metionina es 1: 0,1 a 0,5 (p/p);
  - d. acetato de sodio trihidrato es 1:0,1 a 1,0 (p/p); y
  - e. cloruro de sodio es 1:0,5 a 2,0 (p/p);  
opcionalmente en la que la relación de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno a: EDTA es 1: 0,1 a 0,5 (p/p).
- 40 8. Una formulación oral en polvo que comprende una dosis unitaria de 0,1 mg a 10 mg de un anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo y 0,58 mg de acetato de sodio trihidrato, 1,25 mg de cloruro de sodio, 0,034 mg de polisorbato 80, 34 mg de trehalosa y 0,17 mg de metionina por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende además opcionalmente 0,17 mg de EDTA por 1 mg de anticuerpo anti-CD3 o fragmento de unión a antígeno del mismo;  
en la que el anticuerpo anti-CD3 comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
- 45 9. La formulación oral en polvo de la reivindicación 8, en la que la dosis unitaria es 0,5 mg, 2,5 mg o 5,0 mg.
- 50 10. La formulación oral en polvo de la reivindicación 8 o 9, en la que la formulación es una formulación en polvo liofilizada.
- 55 11. Una cápsula oral con recubrimiento entérico que comprende la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 60 12. La formulación oral o cápsula de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación comprende además al menos un agente activo adicional seleccionado del grupo que consiste en: un inhibidor de NF- $\kappa$ B, un GLP-1 o un compuesto que induce el reposo de células beta, mesalamina u otro fármaco 5-

ASA, pentoxifilina, ácido ursodesoxicólico, un agonista de PPARy, ácido todo transretinoico (ATRA), una gliptina, un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos, un agonista de FXR, un secuestrante de ácidos biliares, un inhibidor de SGLT2, un mAb anti-IL-6R, un anticuerpo anti-TNF, un compuesto antiinflamatorio y/o inmunosupresor, tacrolimus, un corticosteroide, una estatina, interferón beta, acetato de glatiramer, interferón beta-1a, interferón beta-1a, interferón beta-1b, mitoxantrona, dexametasona, metilprednisolona, prednisona, y un fármaco contra la obesidad.

5 13. La formulación oral o cápsula de la reivindicación 12, en la que:

- (a) la gliptina es sitagliptina;
- (b) el inhibidor de la síntesis de ácidos grasos es cerulenina, quer cetina, apigenina o AICAR;
- (c) el agonista de FXR es un activador de sales biliares, ácido quenodesoxicólico, ácido obeticólico, fexaramina o cafestol;
- (d) el secuestrante de ácidos biliares es colestiramina, colestipol o coleserelam;
- (e) el inhibidor de SGLT2 es dapagliflozina;
- (f) el anticuerpo anti-TNF es Infliximab, Adalimumab o Etanercept; y/o
- (g) el compuesto antiinflamatorio y/o inmunosupresor es metotrexato, ciclosporina o una microemulsión de ciclosporina.

10 14. La cápsula oral con recubrimiento entérico de una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, para uso en un método para tratar o aliviar un síntoma de una enfermedad autoinmune, un trastorno inflamatorio, una enfermedad neurodegenerativa o cáncer, que comprende administrar la cápsula oral con recubrimiento entérico a un sujeto que lo necesita, opcionalmente en el que la enfermedad autoinmune es esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis biliar primaria (CBP), diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, o colitis ulcerosa (CU).

15 15. La cápsula oral con recubrimiento entérico para uso de la reivindicación 14, en la que el método comprende además administrar al sujeto al menos un agente activo adicional seleccionado del grupo que consiste en: un inhibidor de NF-kB, un GLP-1 o un compuesto que induce el reposo de células beta, mesalamina u otro fármaco 5-ASA, pentoxifilina, ácido ursodesoxicólico, un agonista de PPARy, ácido todo transretinoico (ATRA), una gliptina, un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos, un agonista de FXR, un secuestrante de ácidos biliares, un inhibidor de SGLT2, un mAb anti-IL-6R, un anticuerpo anti-TNF, un compuesto antiinflamatorio y/o inmunosupresor, tacrolimus, un corticosteroide, una estatina, interferón beta, acetato de glatiramer, interferón beta-1a, interferón beta-1a, interferón beta-1b, mitoxantrona, dexametasona, metilprednisolona, prednisona, y un fármaco contra la obesidad.

20 16. La formulación oral o cápsula para uso de la reivindicación 15, en la que:

- (a) la gliptina es sitagliptina;
- (b) el inhibidor de la síntesis de ácidos grasos es cerulenina, quer cetina, apigenina o AICAR;
- (c) el agonista de FXR es un activador de sales biliares, ácido quenodesoxicólico, ácido obeticólico, fexaramina o cafestol;
- (d) el secuestrante de ácidos biliares es colestiramina, colestipol o coleserelam;
- (e) el inhibidor de SGLT2 es dapagliflozina;
- (f) el anticuerpo anti-TNF es Infliximab, Adalimumab o Etanercept; y/o
- (g) el compuesto antiinflamatorio y/o inmunosupresor es metotrexato, ciclosporina o una microemulsión de ciclosporina.

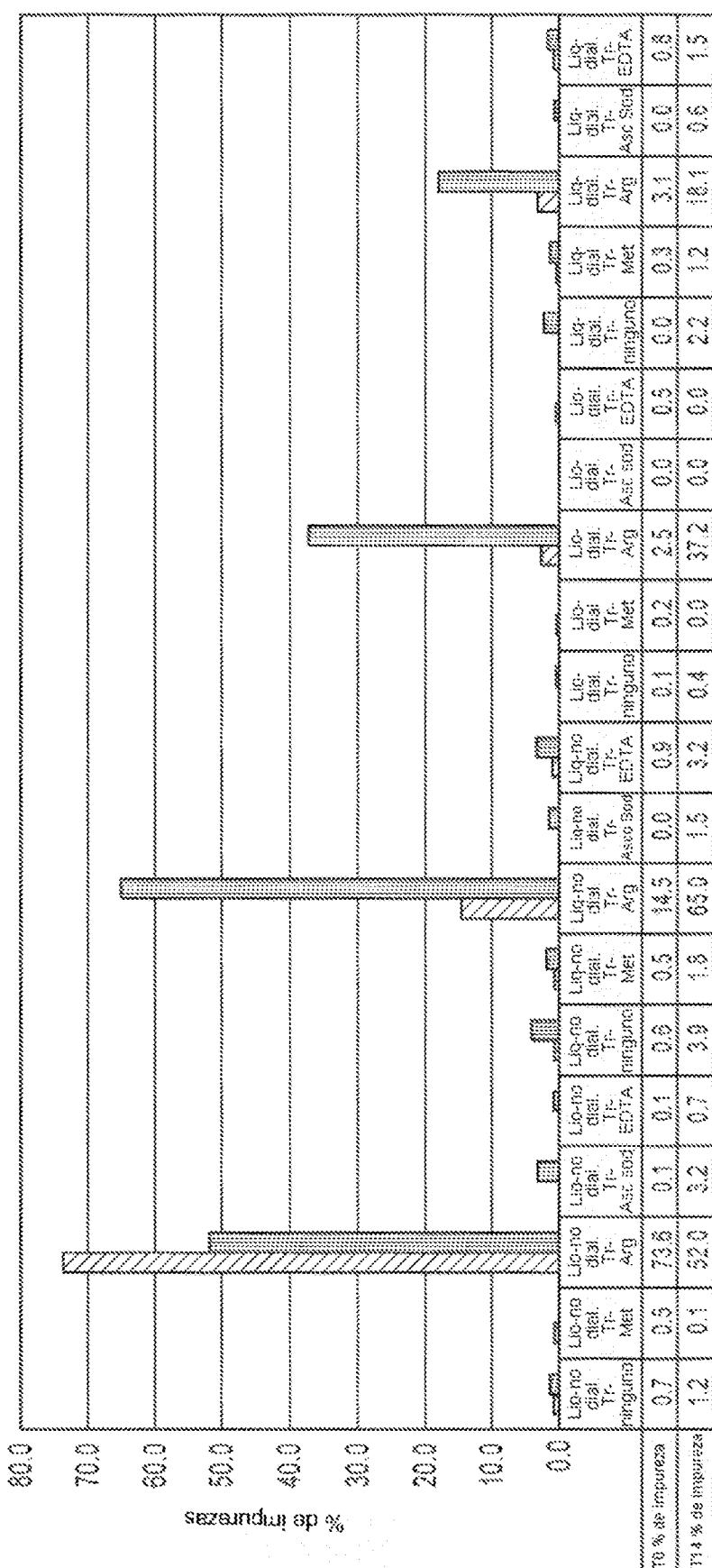


Figura 2

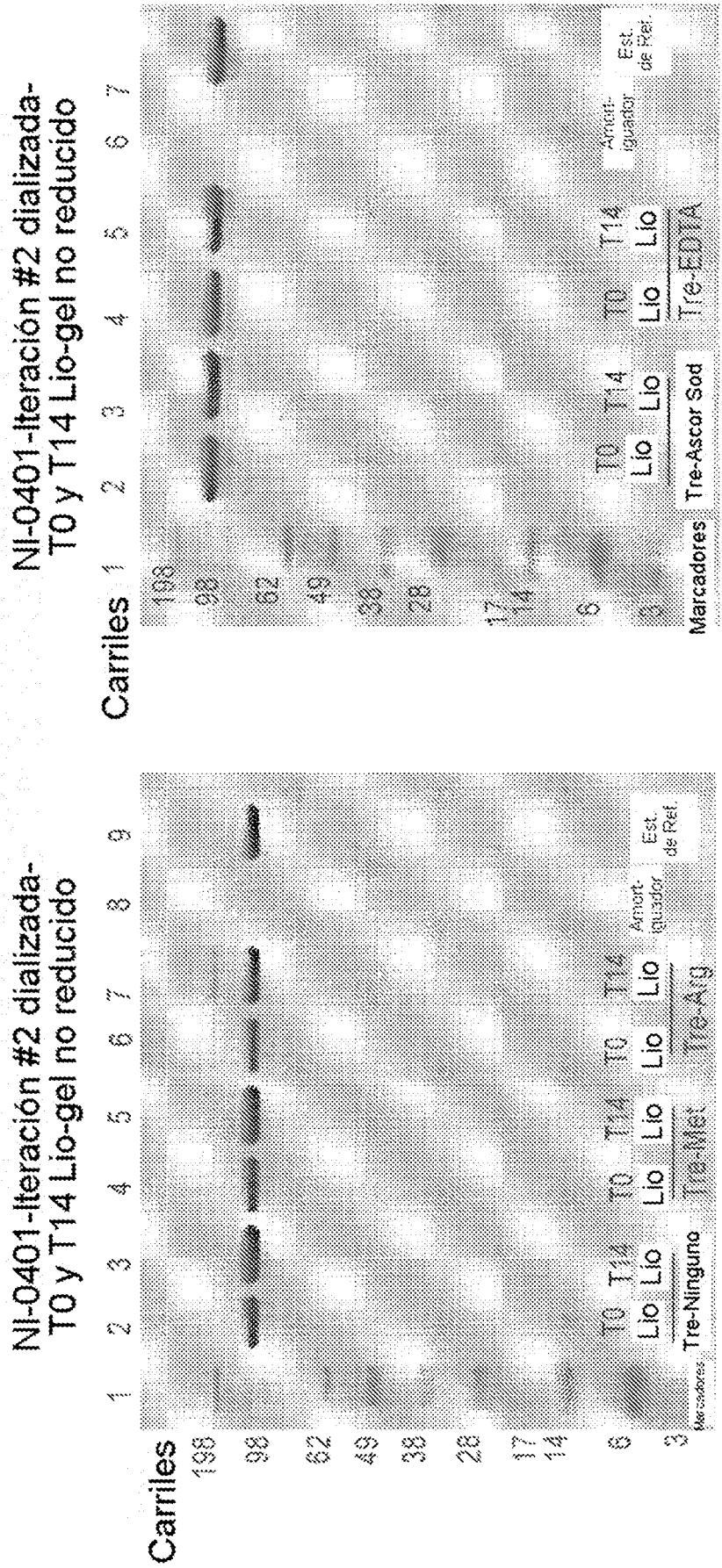


Figura 3

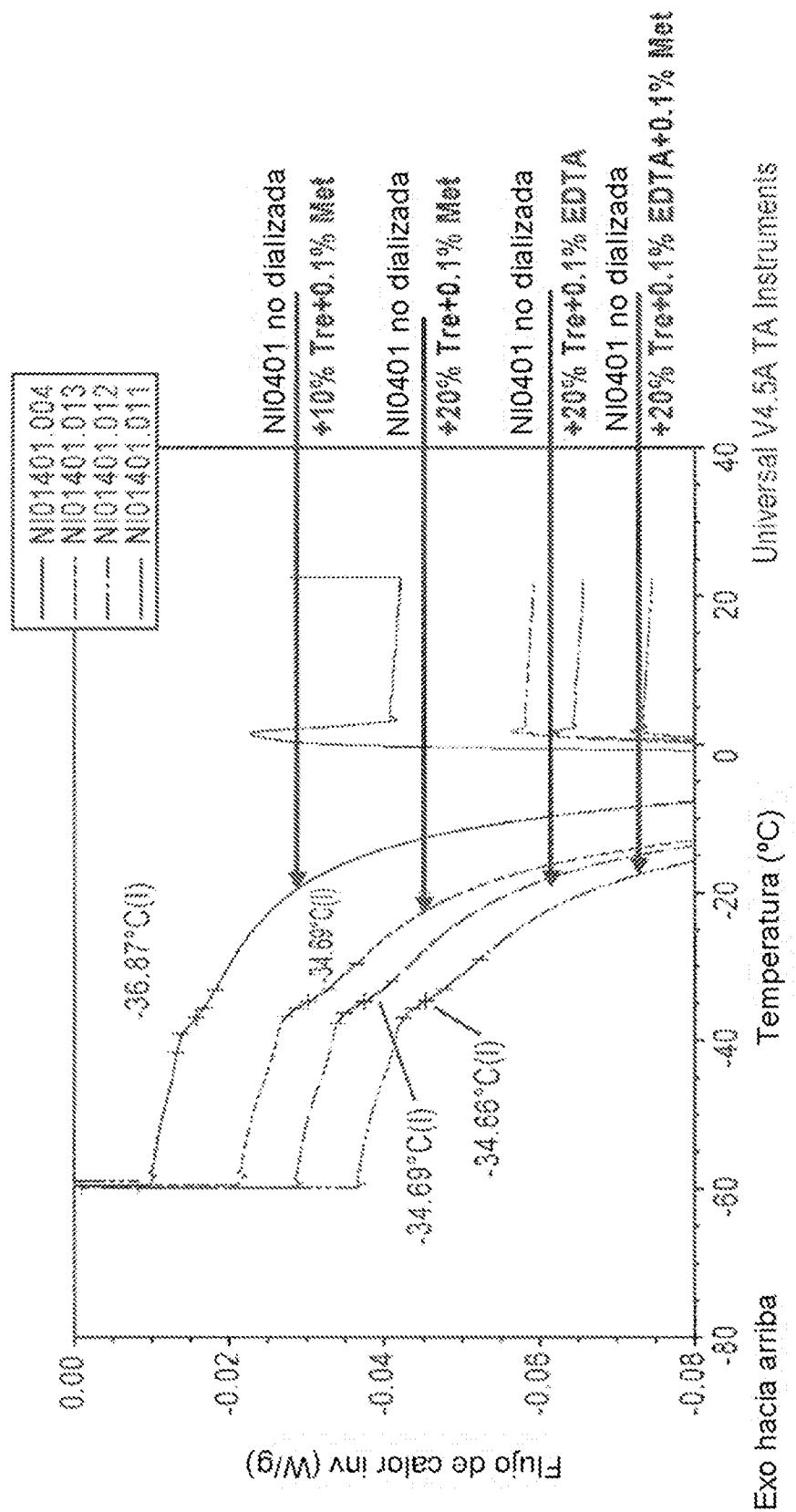


Figura 4

Figura 5

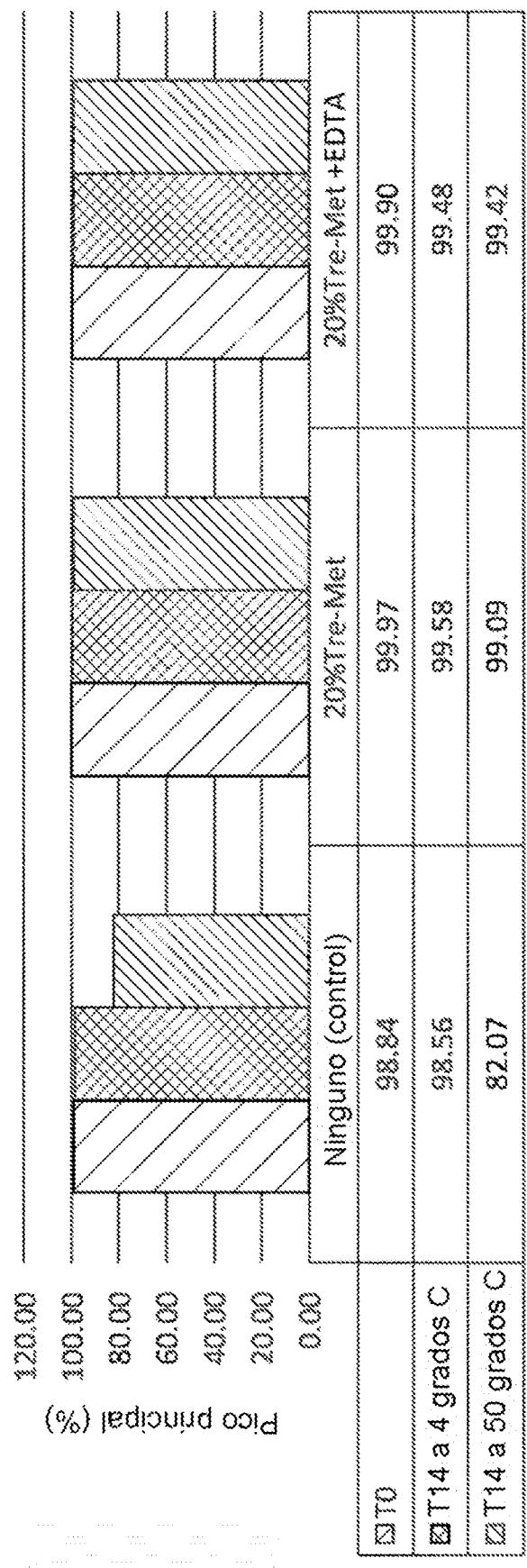


Figura 6

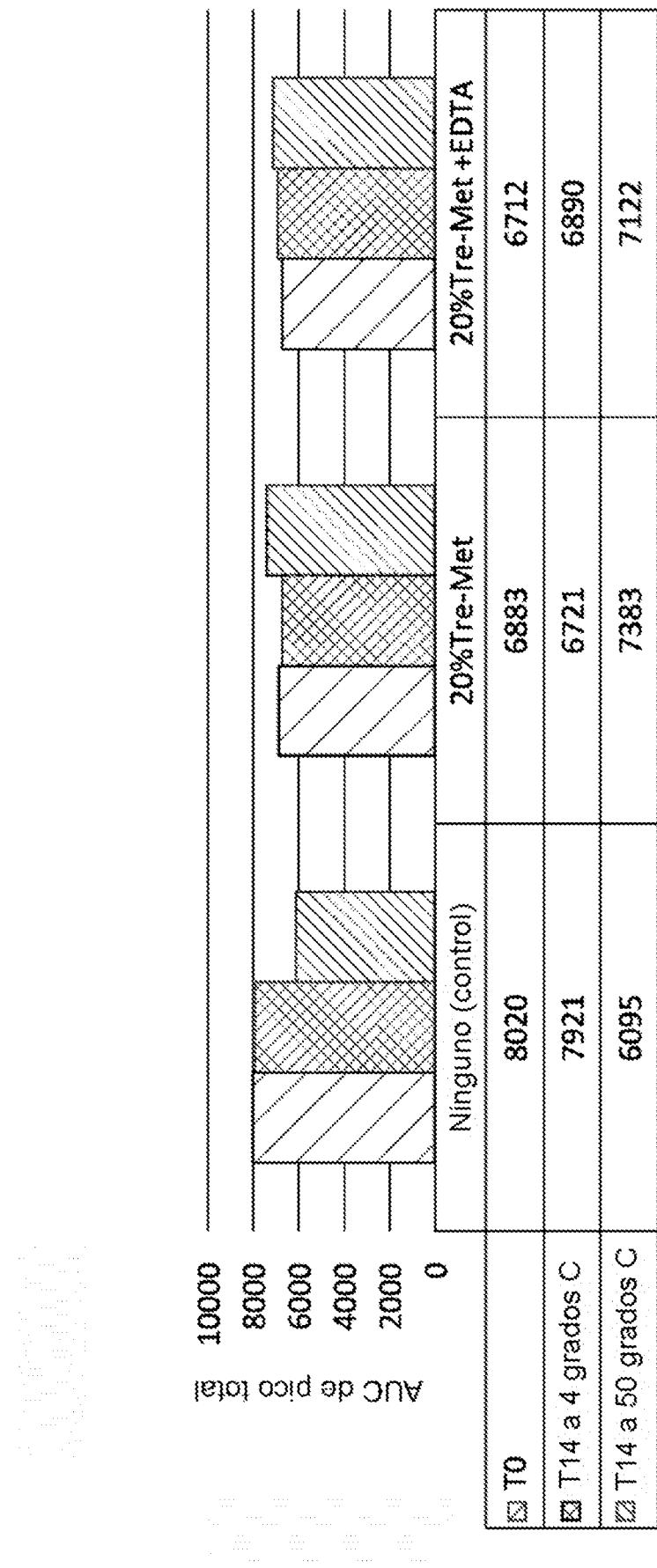


Figura 7

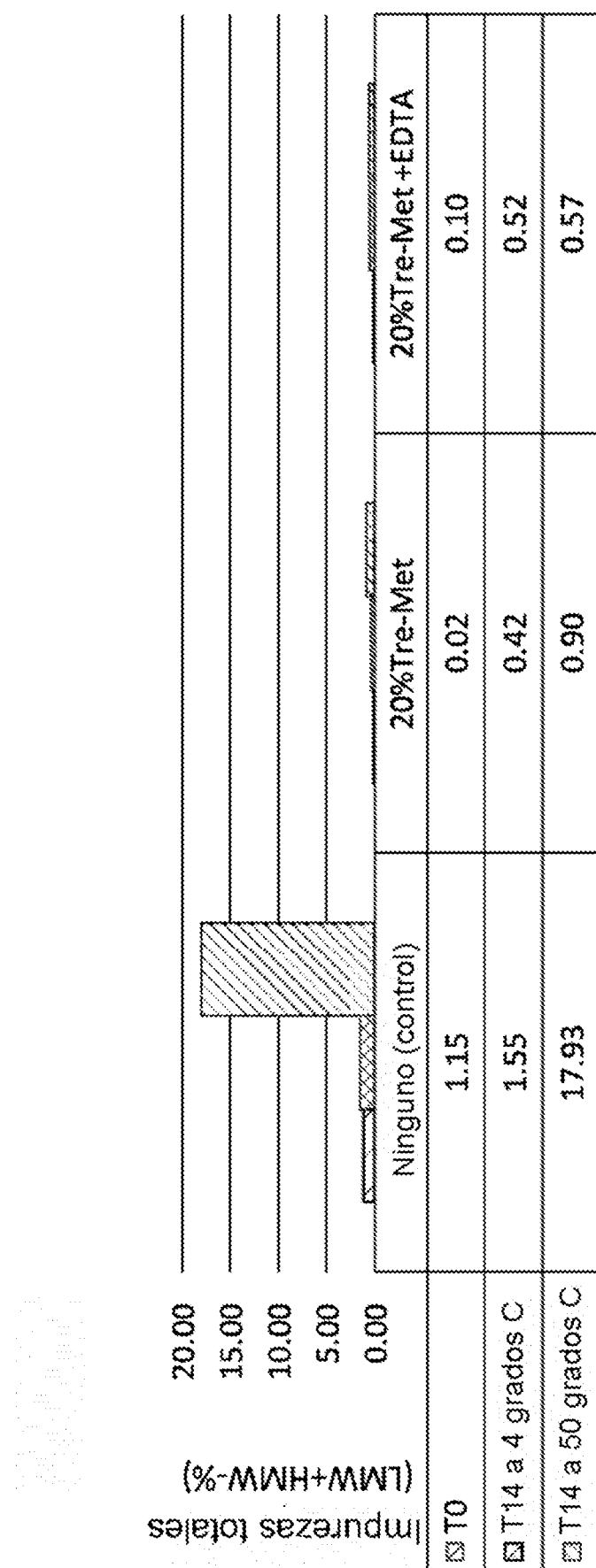


Figura 8

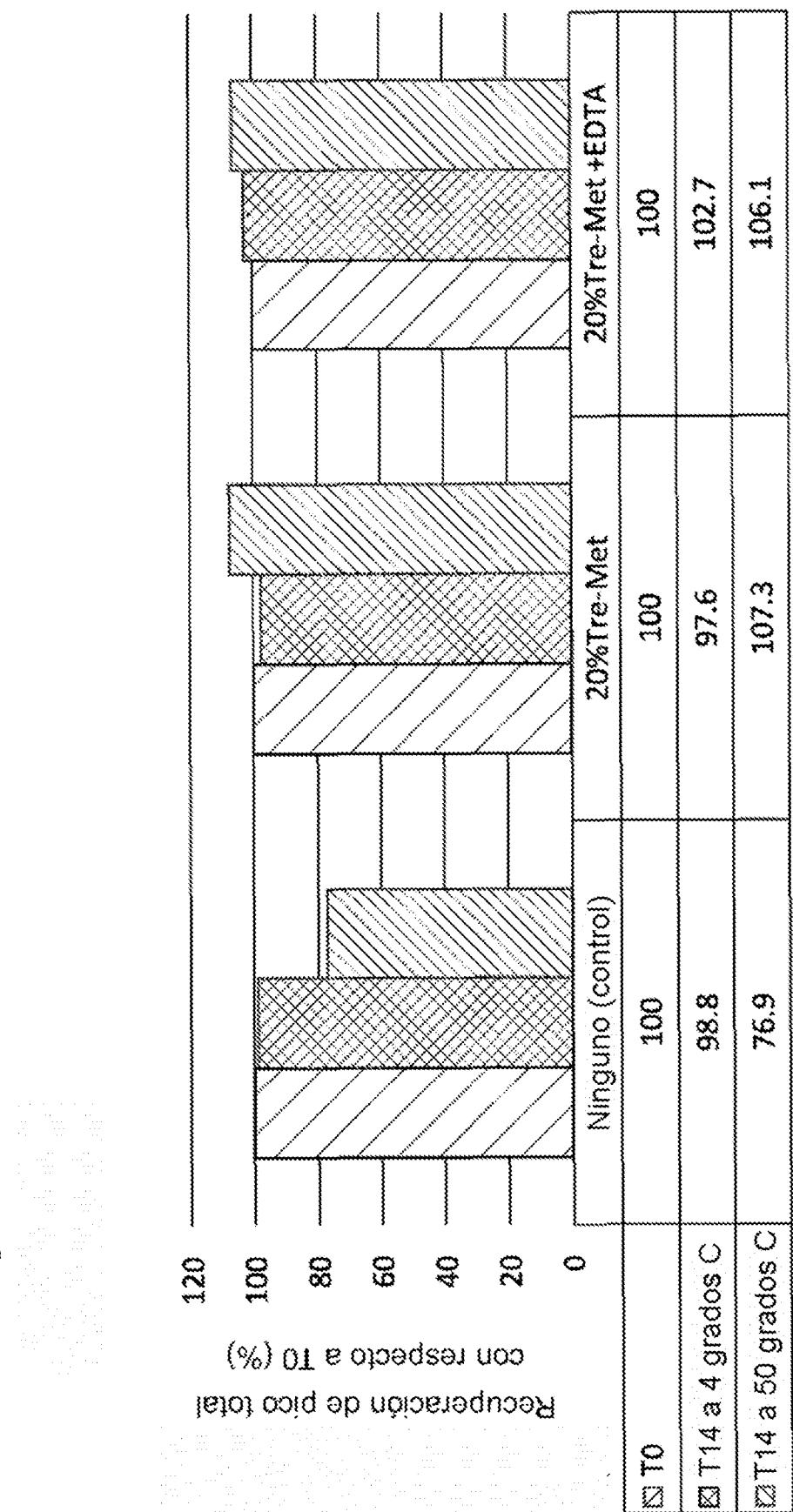
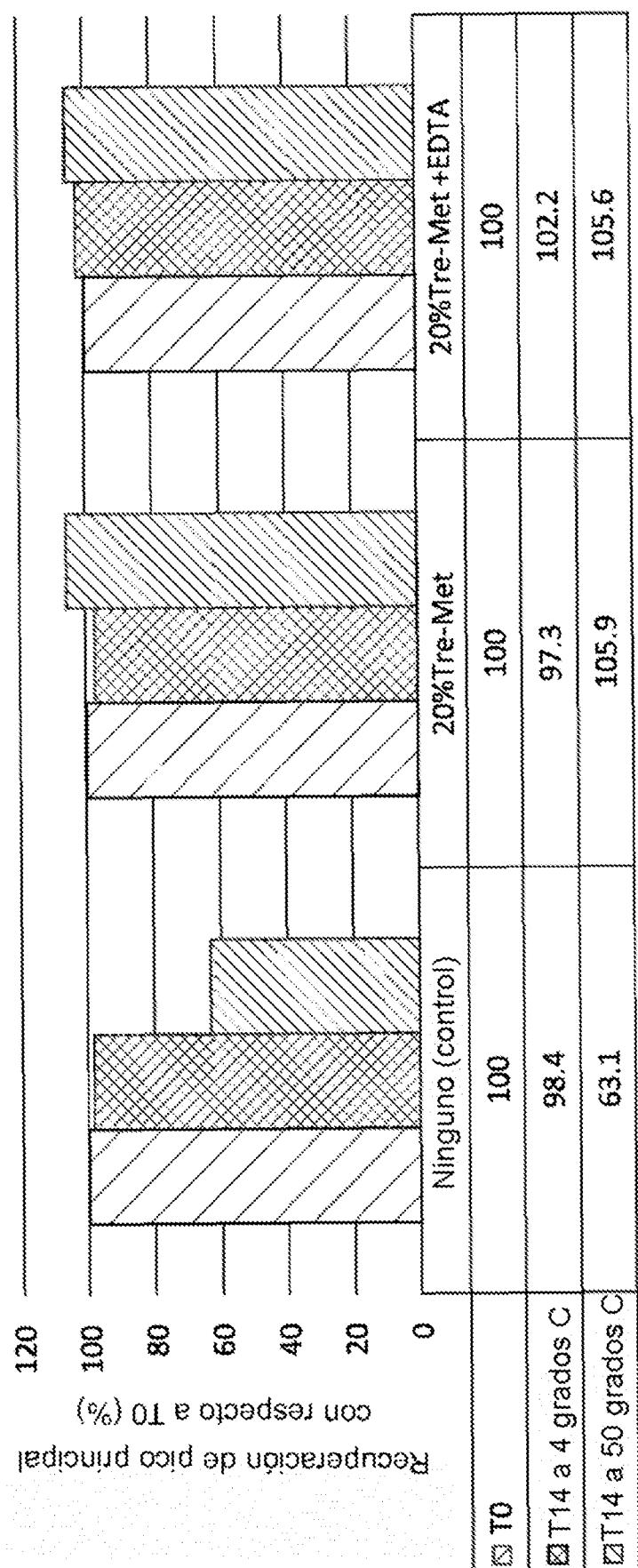


Figura 9



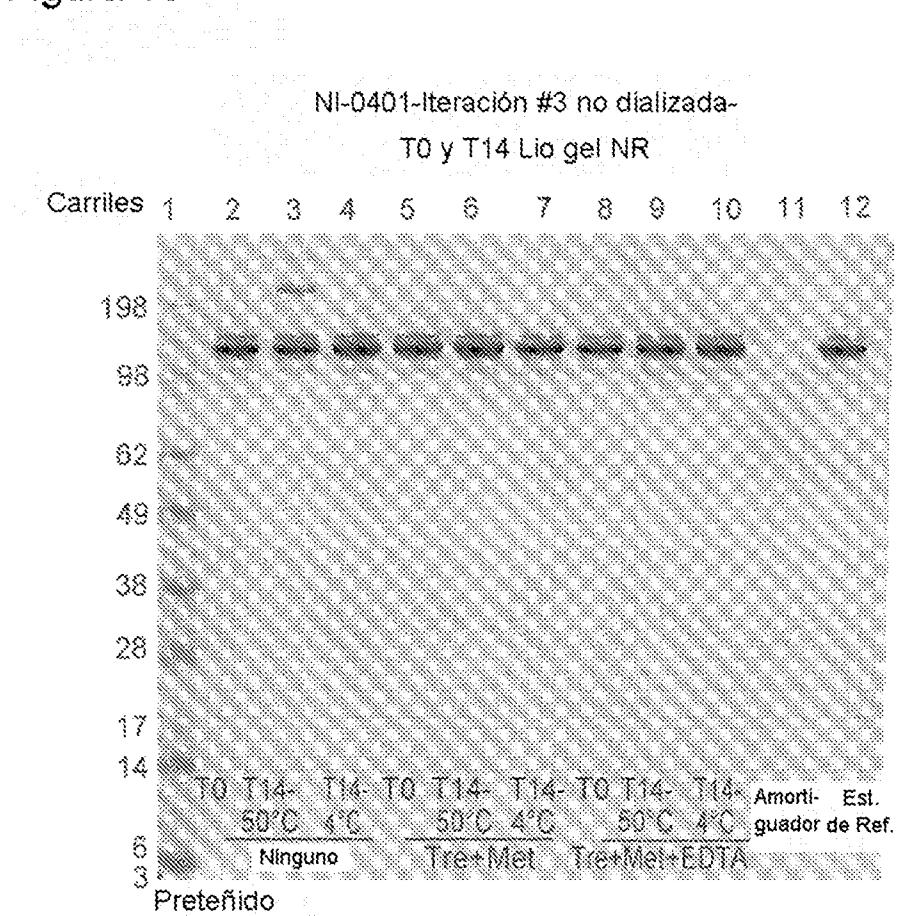
**Figura 10**

Figura 11

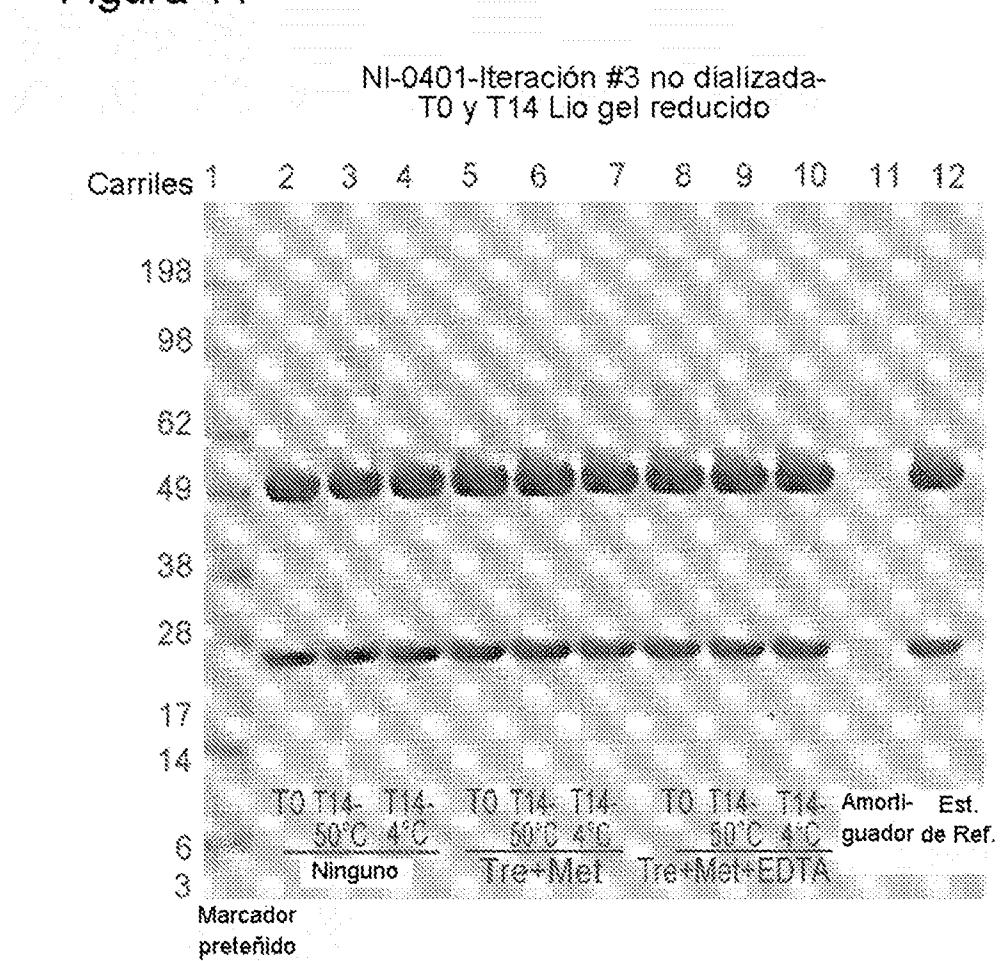


Figura 12

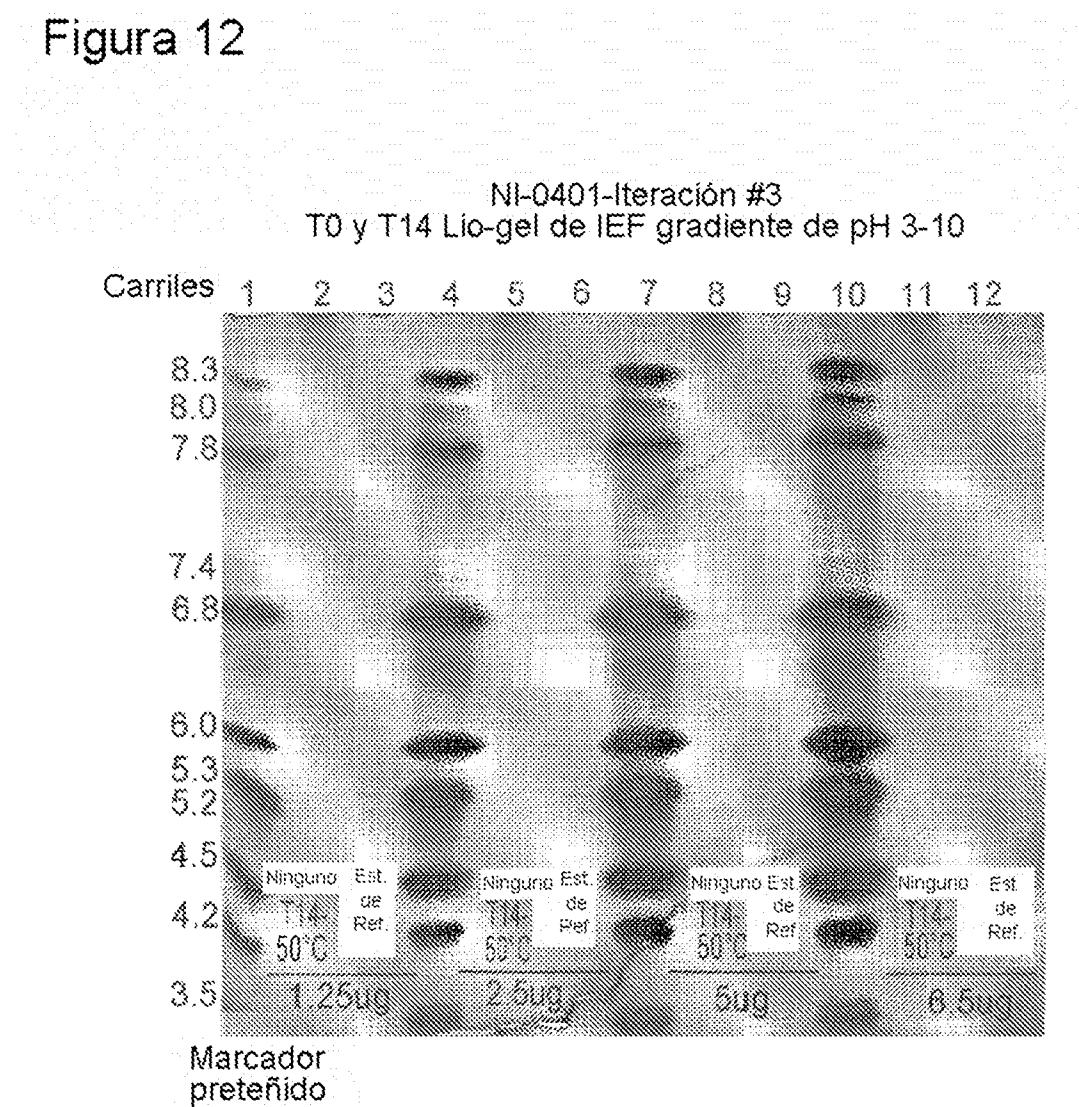


Figura 13

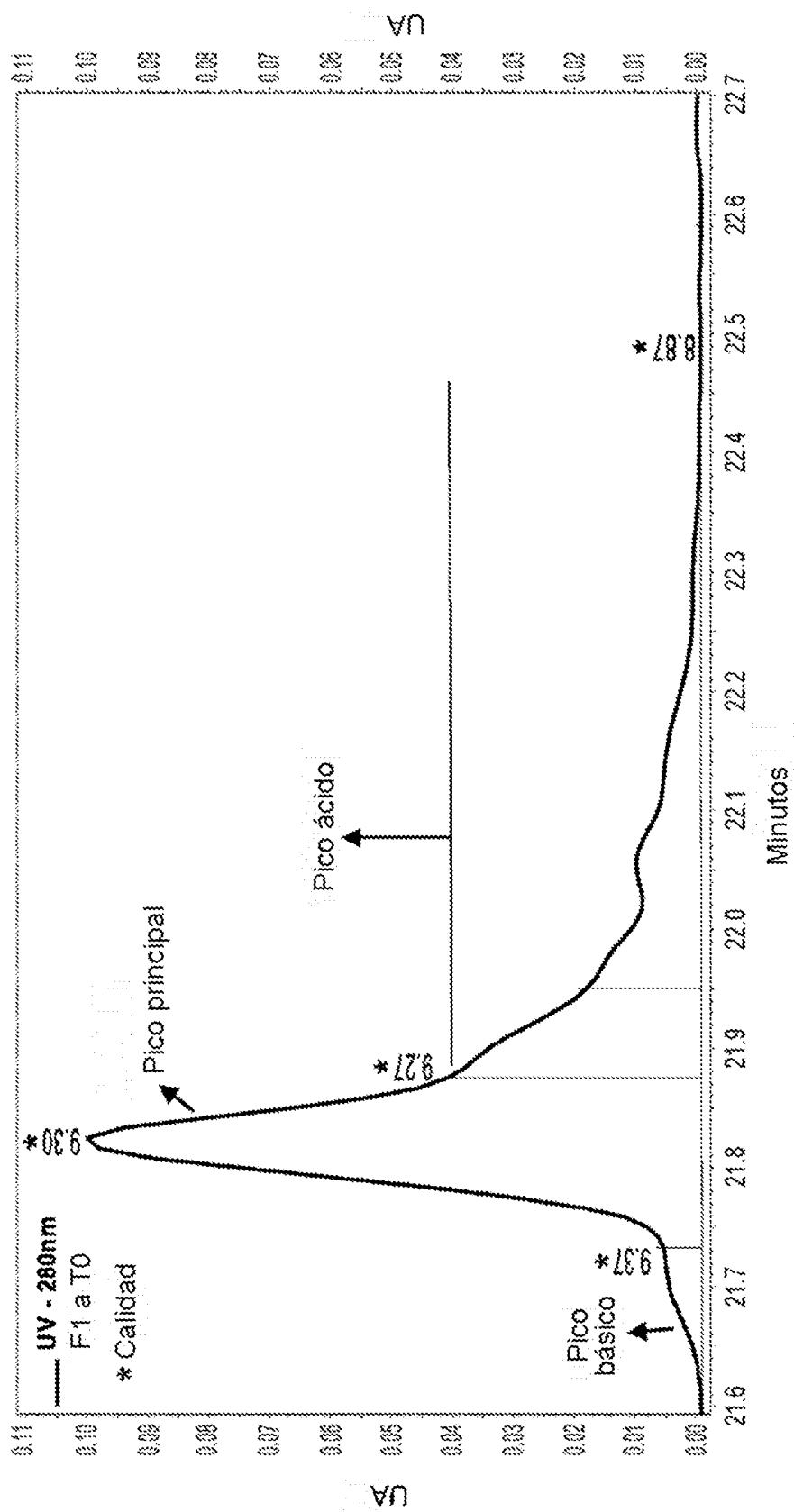


Figura 14

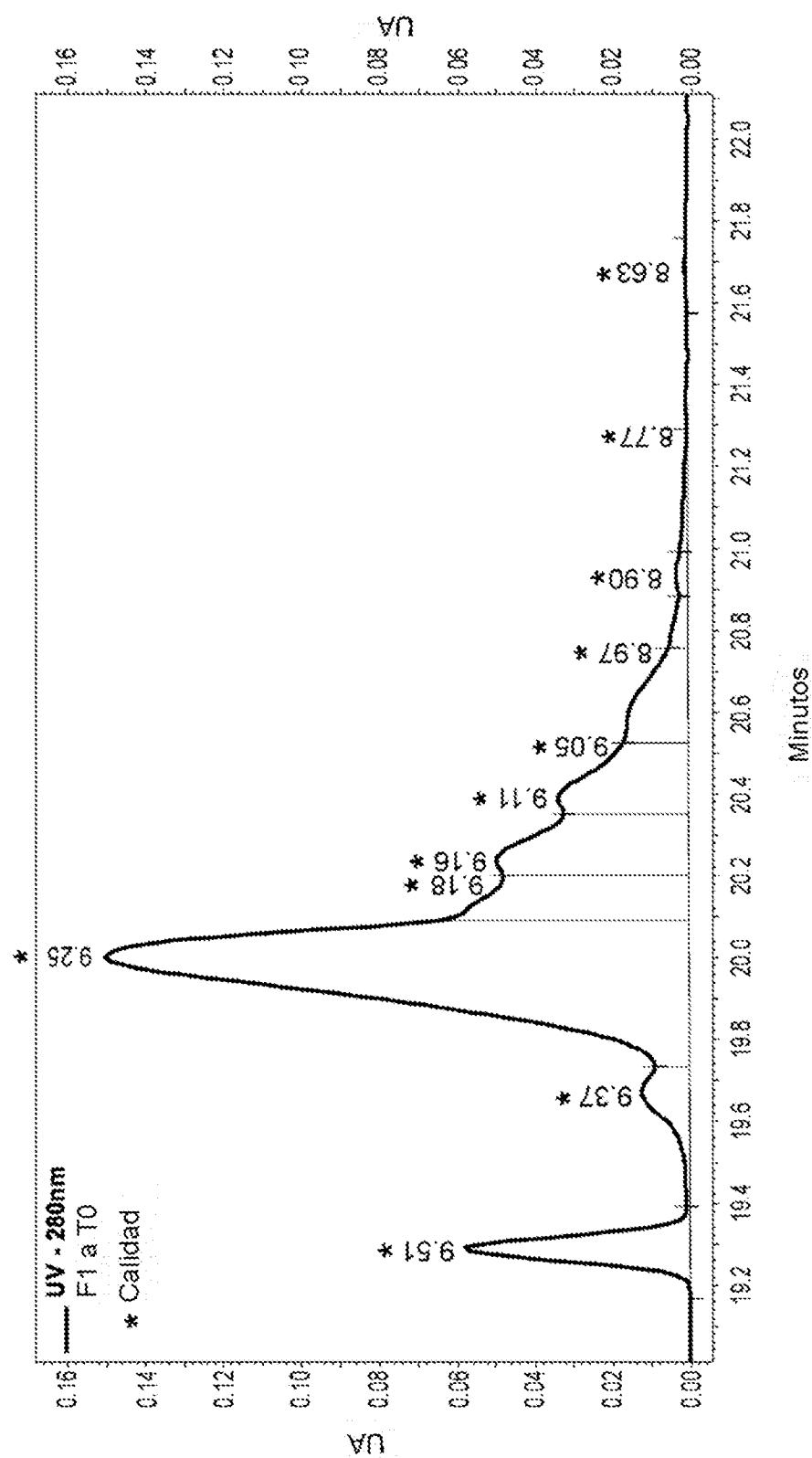


Figura 15

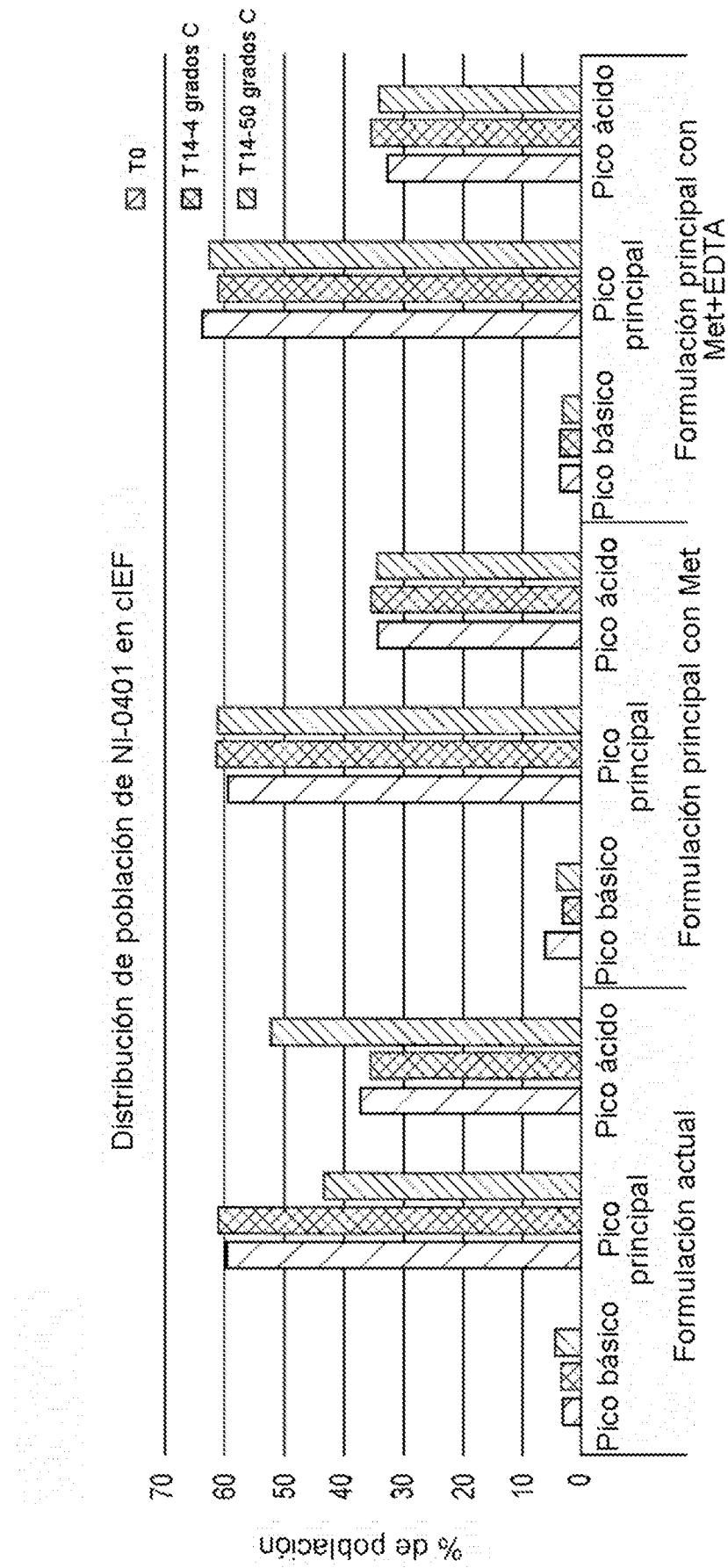


Figura 16

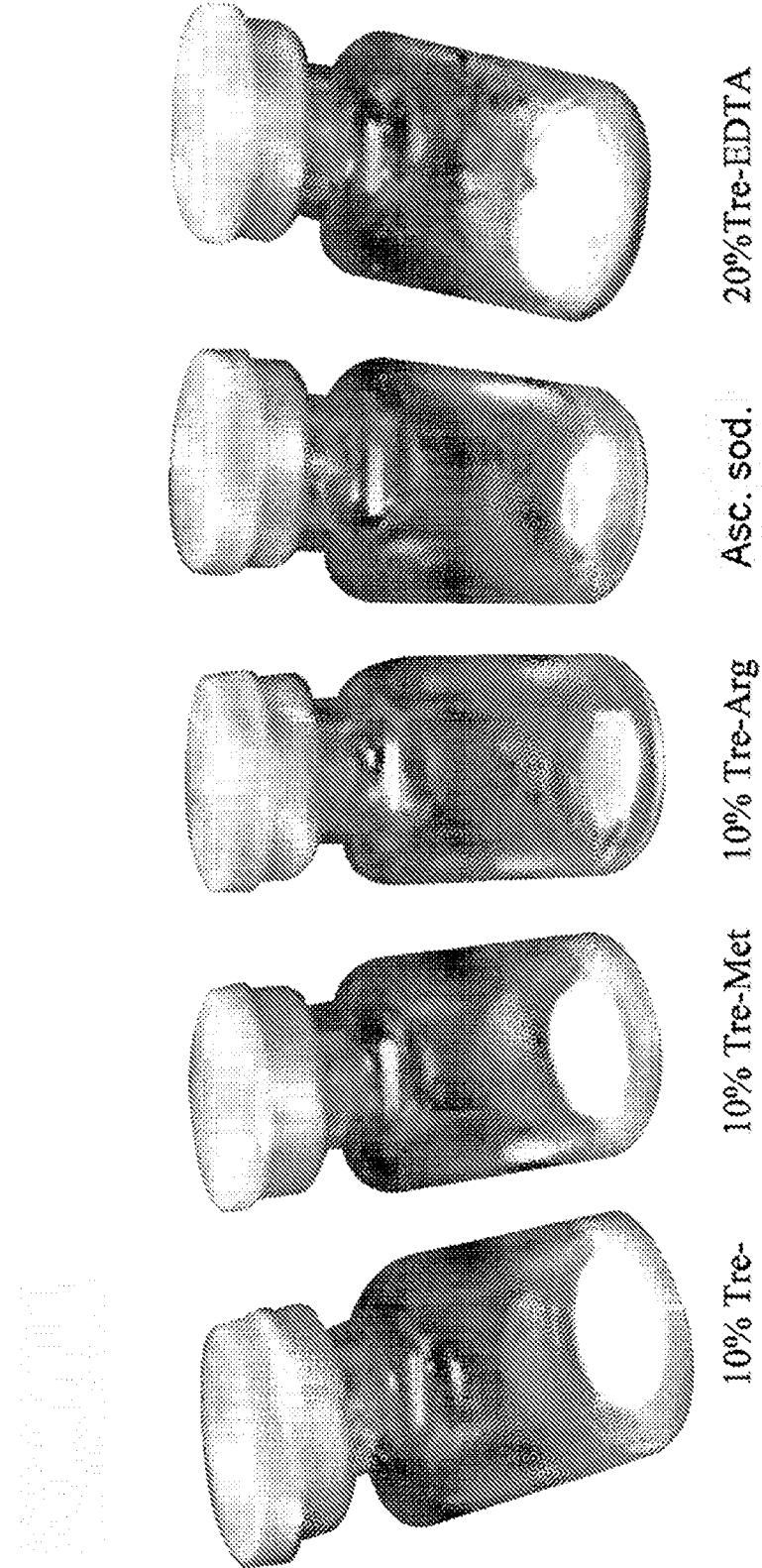


Figura 17

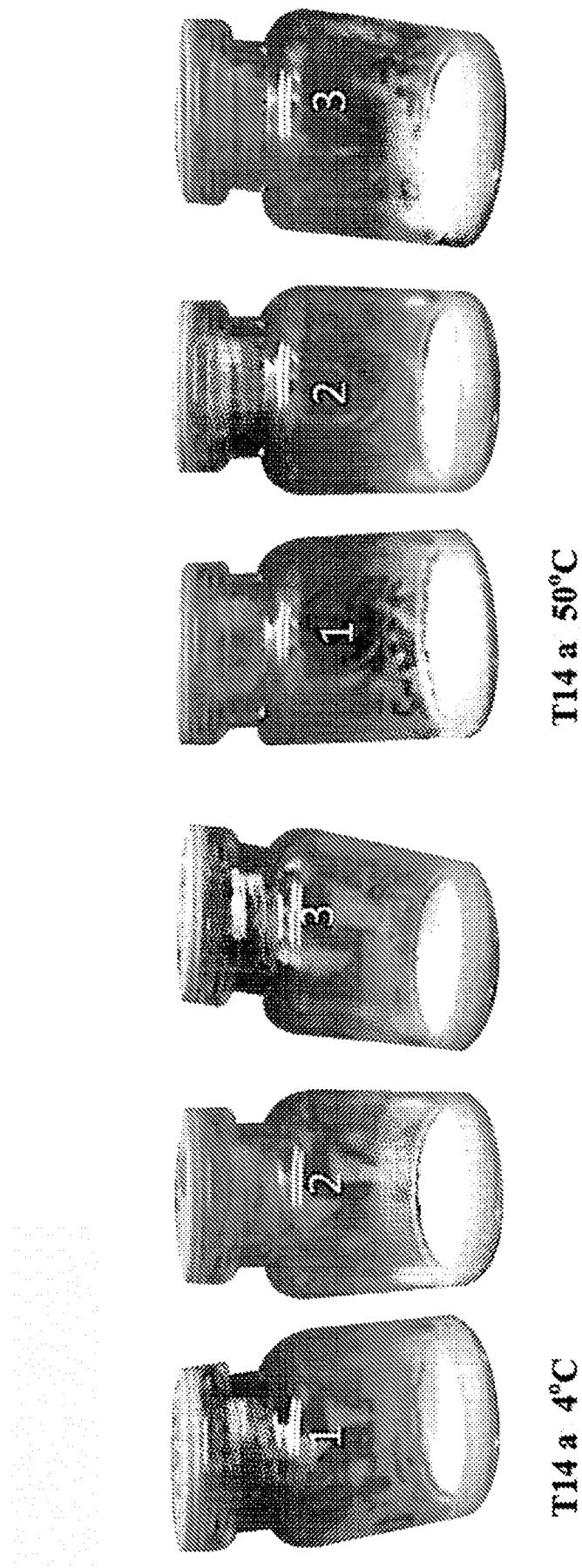
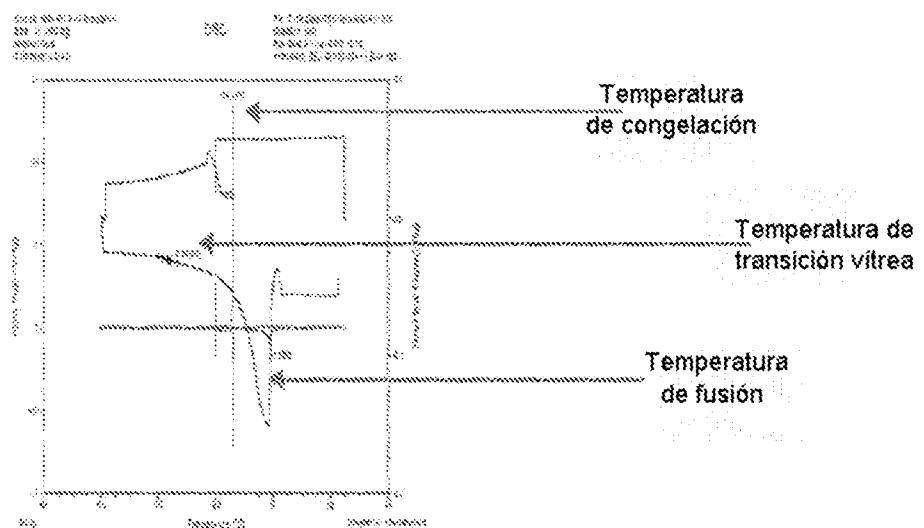


Figura 18



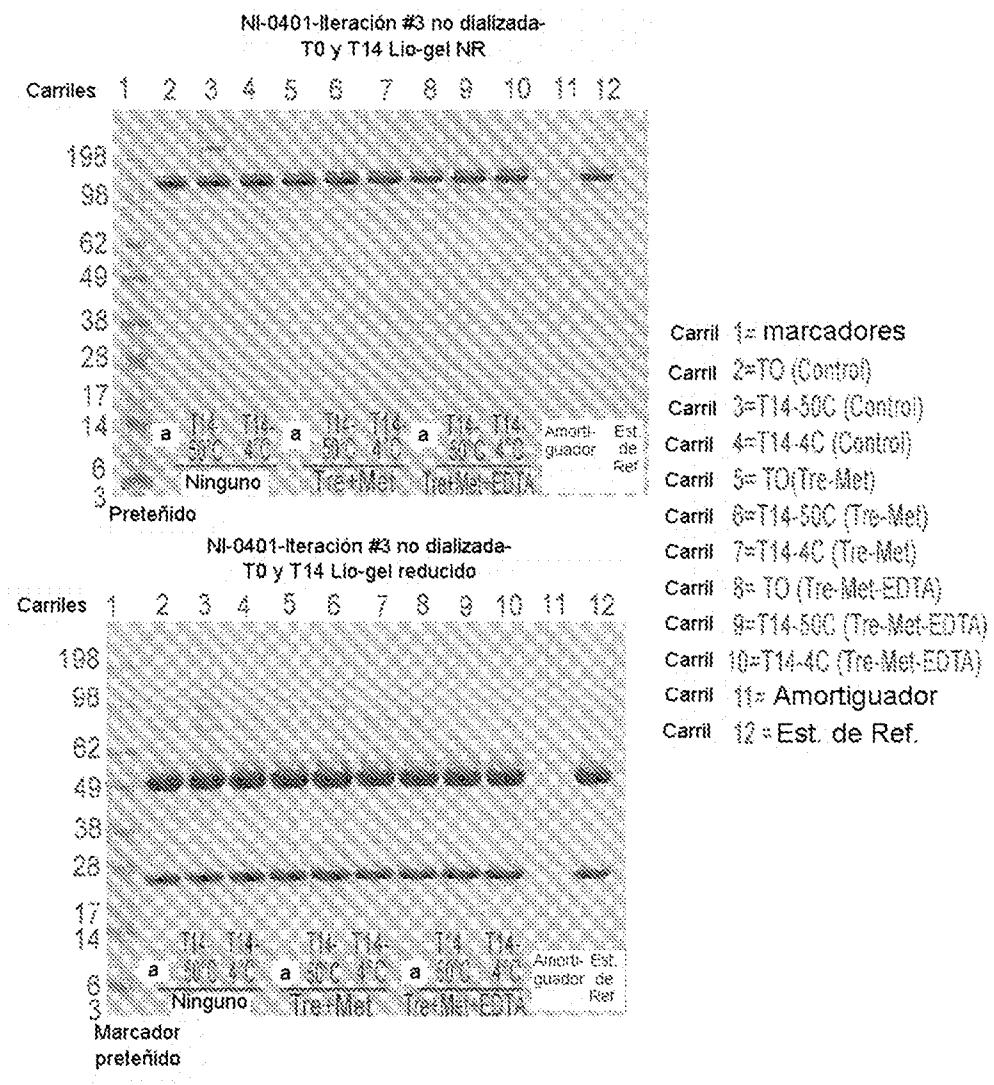


Figura 19

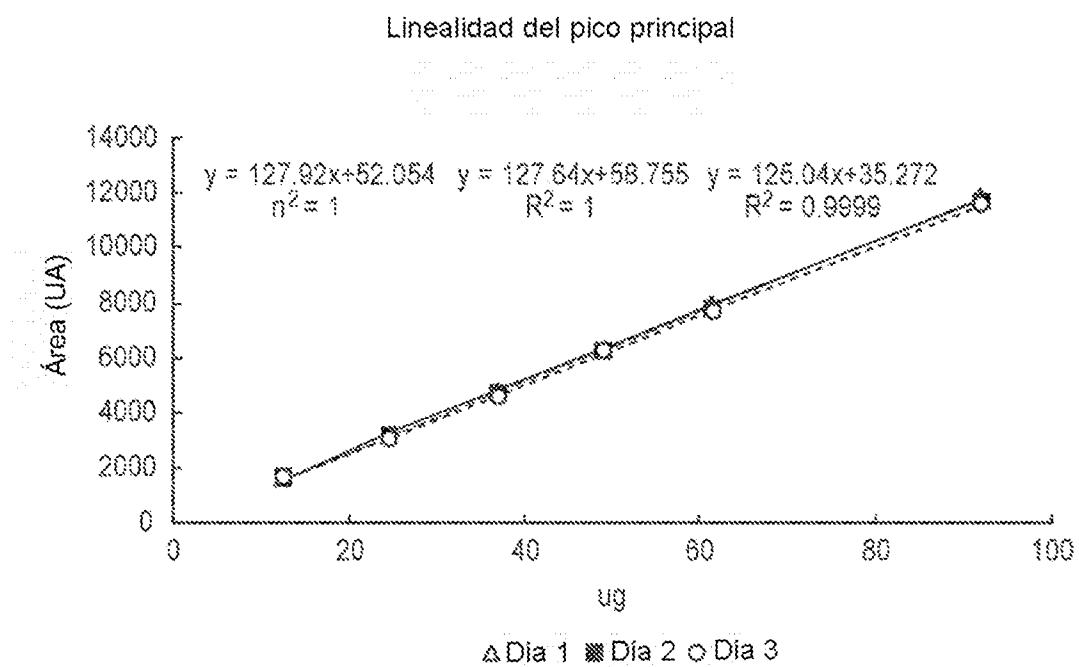
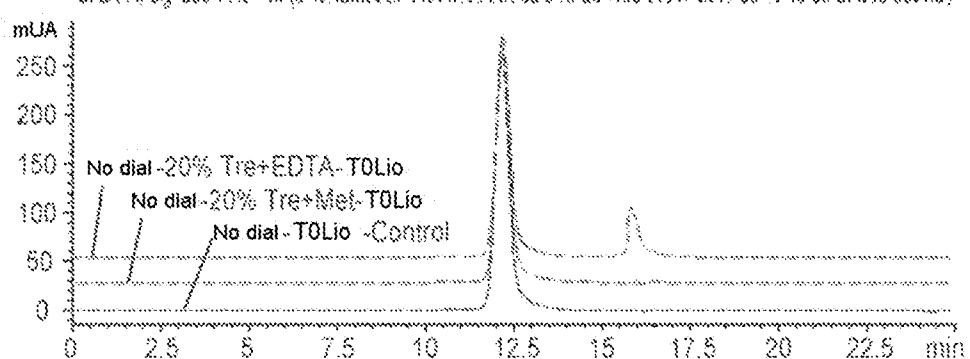


Figura 20

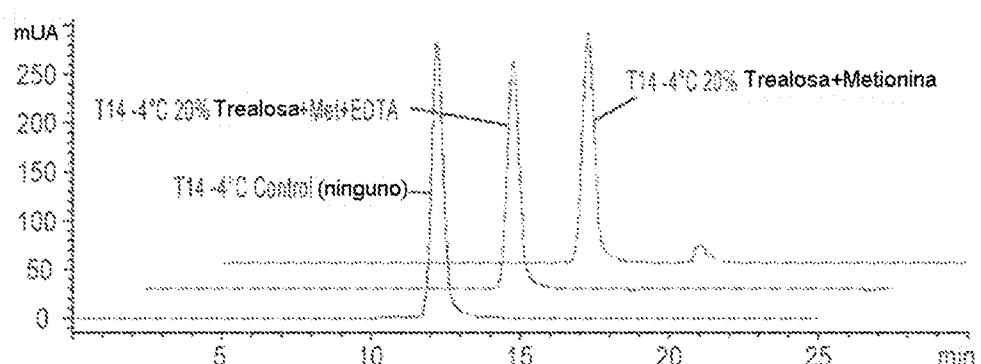
Figura 21

## A. T0

'D401 A, Sig=280.4 Ref=off [C10H26S2L...-0401NTISIANA SEC-NPLC IT#3 61917 2017-06-19 10-03-27004-0601.0]  
'D401 A, Sig=280.4 Ref=off [C10H26S2L...-0401NTISIANA SEC-NPLC IT#3 61917 2017-06-19 10-03-27005-0701.0]  
'D401 A, Sig=280.4 Ref=off [C10H26S2L...-0401NTISIANA SEC-NPLC IT#3 61917 2017-06-19 10-03-27006-0801.0]



## B. T14 a 4°C



## C. T14 a 50°C

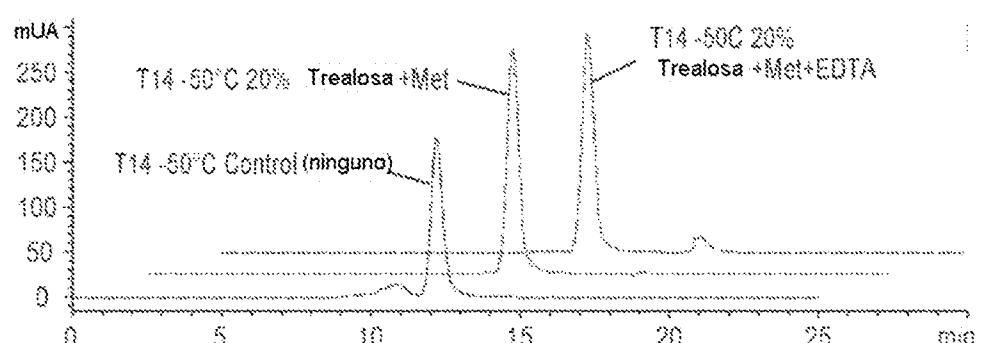
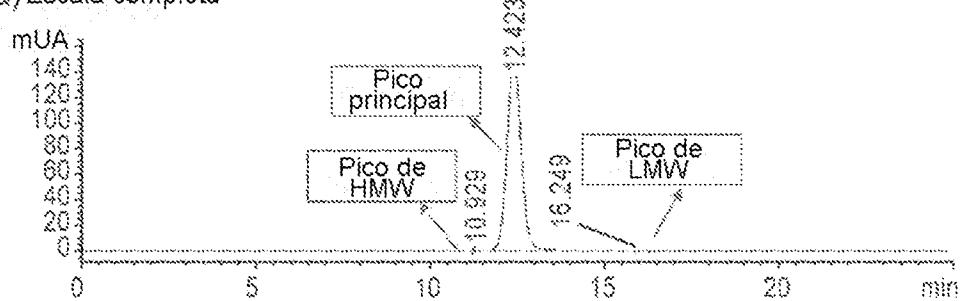
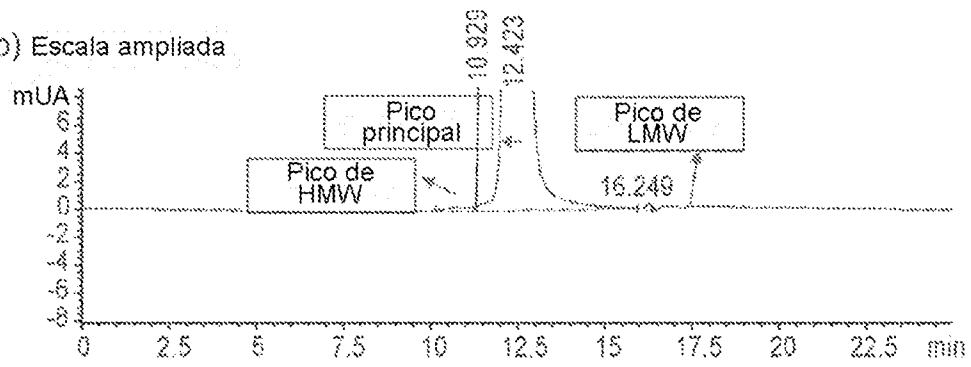


Figura 22

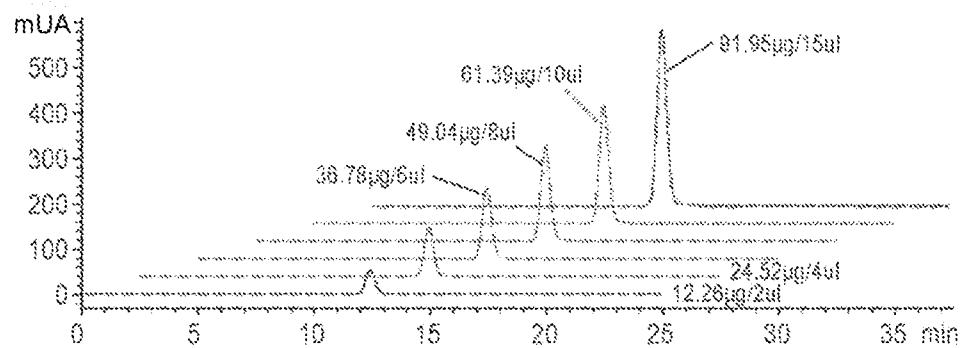
a) Escala completa



b) Escala ampliada

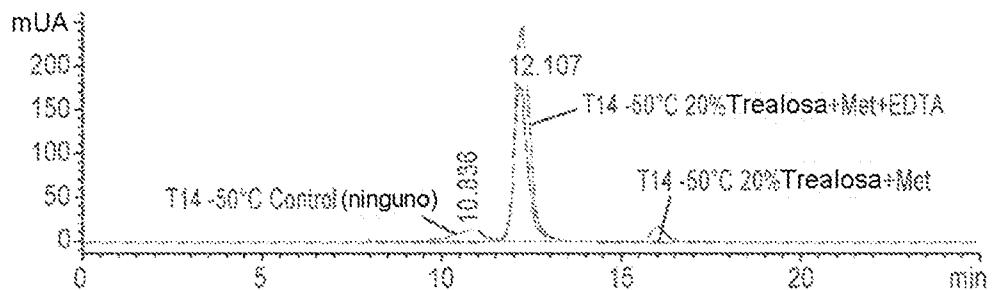


c) Superposición



**Figura 23**

Muestra la superposición de cromatogramas para formulaciones principales de NI0401 frente a formulación de control: T14 mantenida a 50 °C



Muestra la superposición (ampliada) de cromatogramas para formulaciones principales de NI0401 frente a formulación de control: T14 Lio mantenida a 50 °C

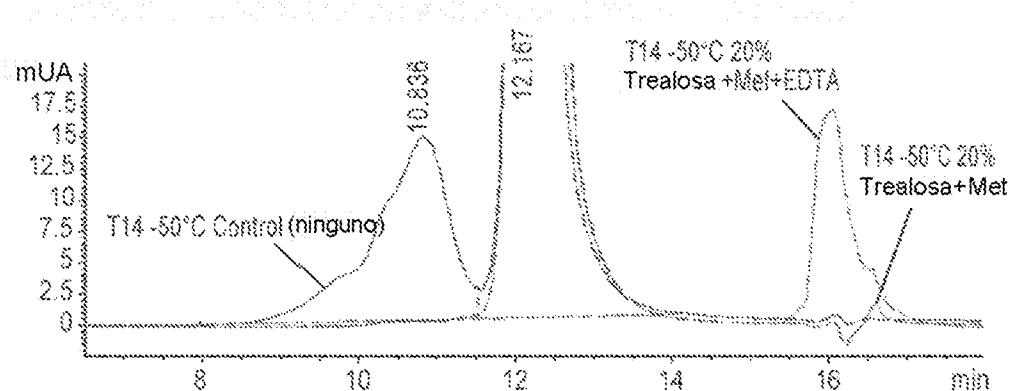


Figura 24

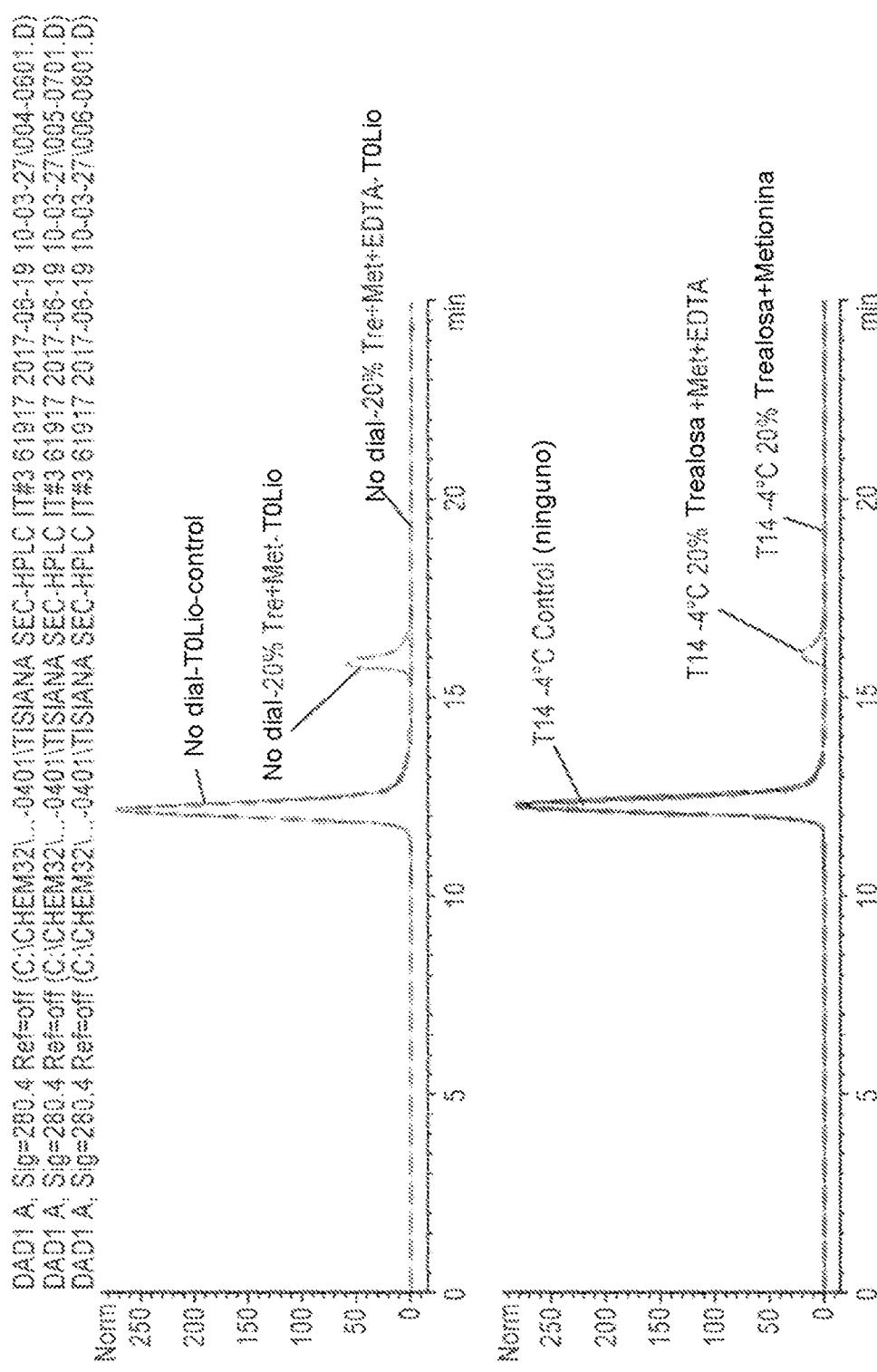


Figura 24 cont.

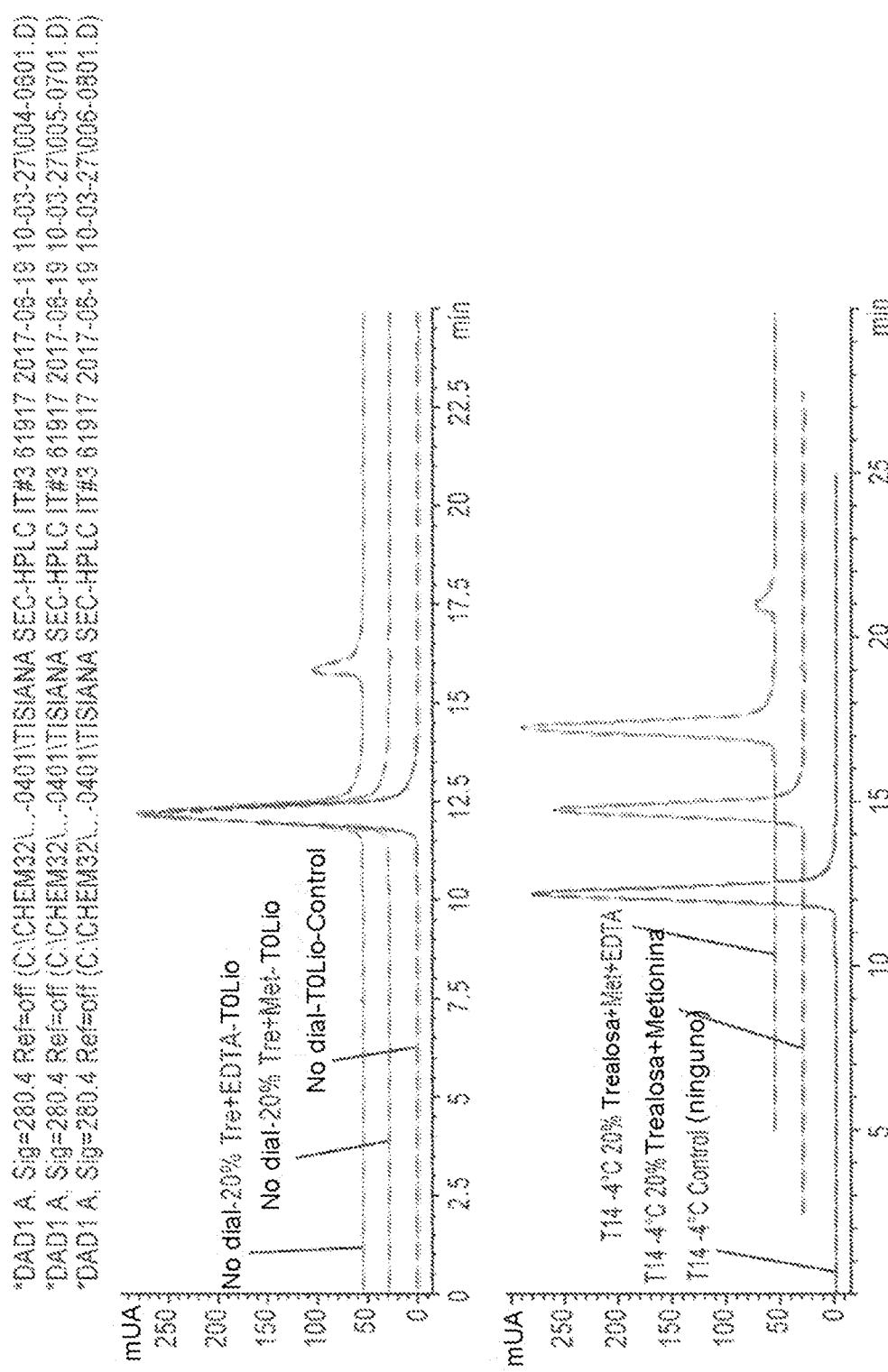


Figura 25

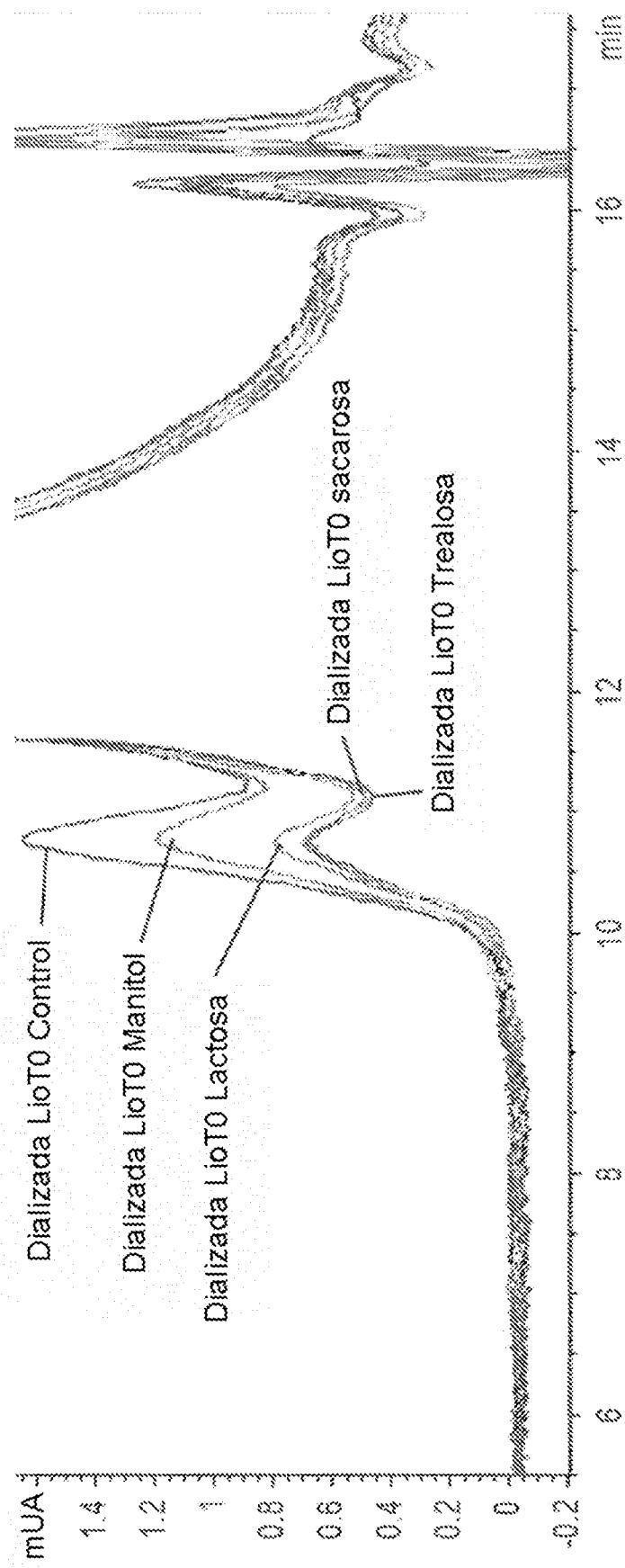


Figura 26

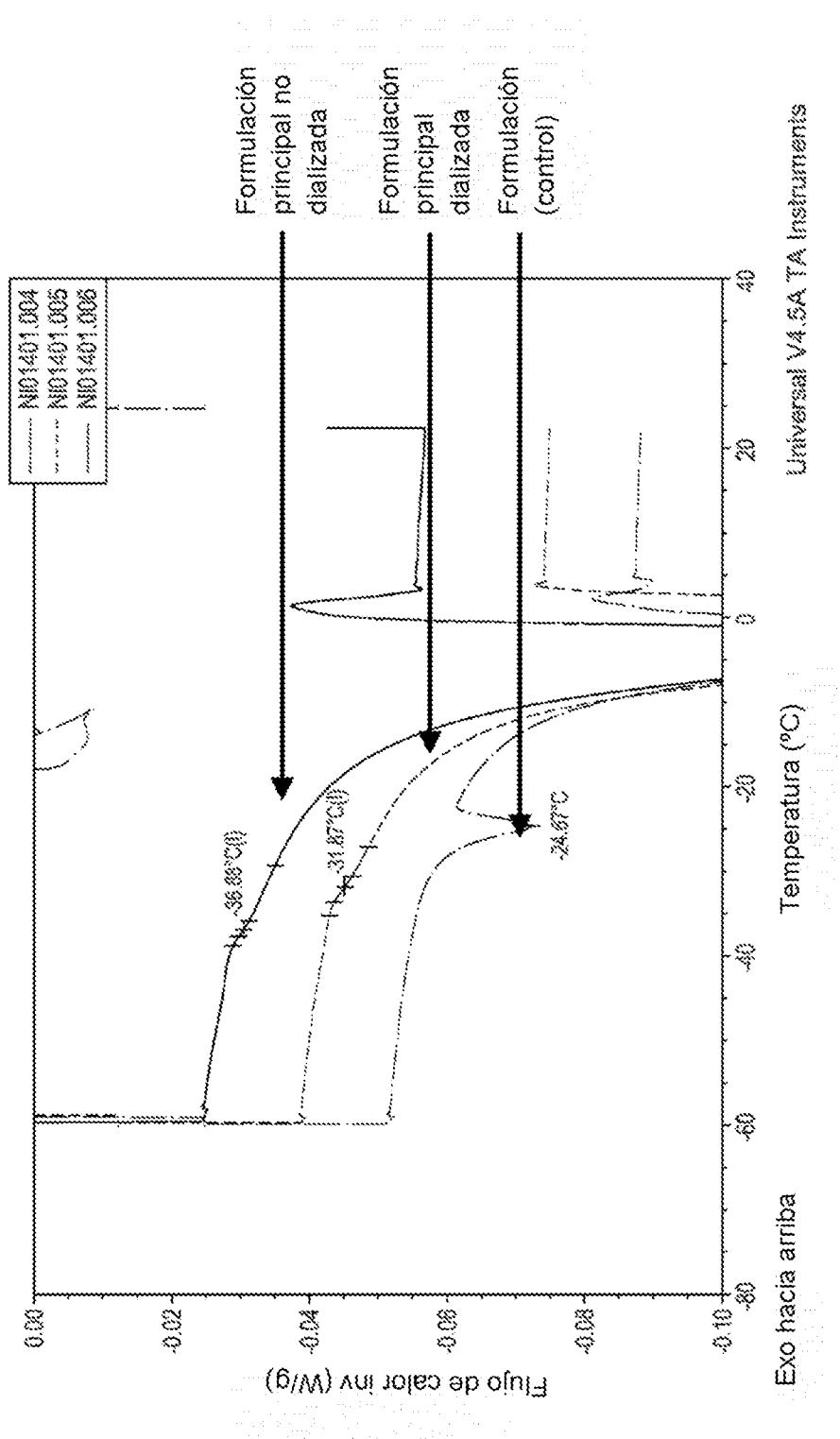


Figura 27

● Ab1	ABS congelados en medio
■ Ab2	
▲ Ab3	
○ Ab4	Placebos
□ Ab5	
△ Ab6	
○○ Ab7	
□□ Ab8	
△△ Ab9	
○○ Ab10	ABS liofilizados método 1 (mantenidos a -80C)
□□ Ab11	
△△ Ab12	
●○ Ab13	ABS liofilizados método 2 (mantenidos a -50C durante 14 d))
■○ Ab14	
▲△ Ab15	
＊ ms anti-hu CD3 APC	Controles
●○ 2º sólo (anti-Hu IgFc APC)	
□○ Hu IgFc y anti-Hu IgGFc APC	

**Figura 28**

células teñidas con cada reactivo de vial de NI-0401/ detectado con anti-IgGFC humano APC (ROJO)

superposición con células teñidas con IgFc humano/ detectado con anti-IgGFC humano APC (AZUL)

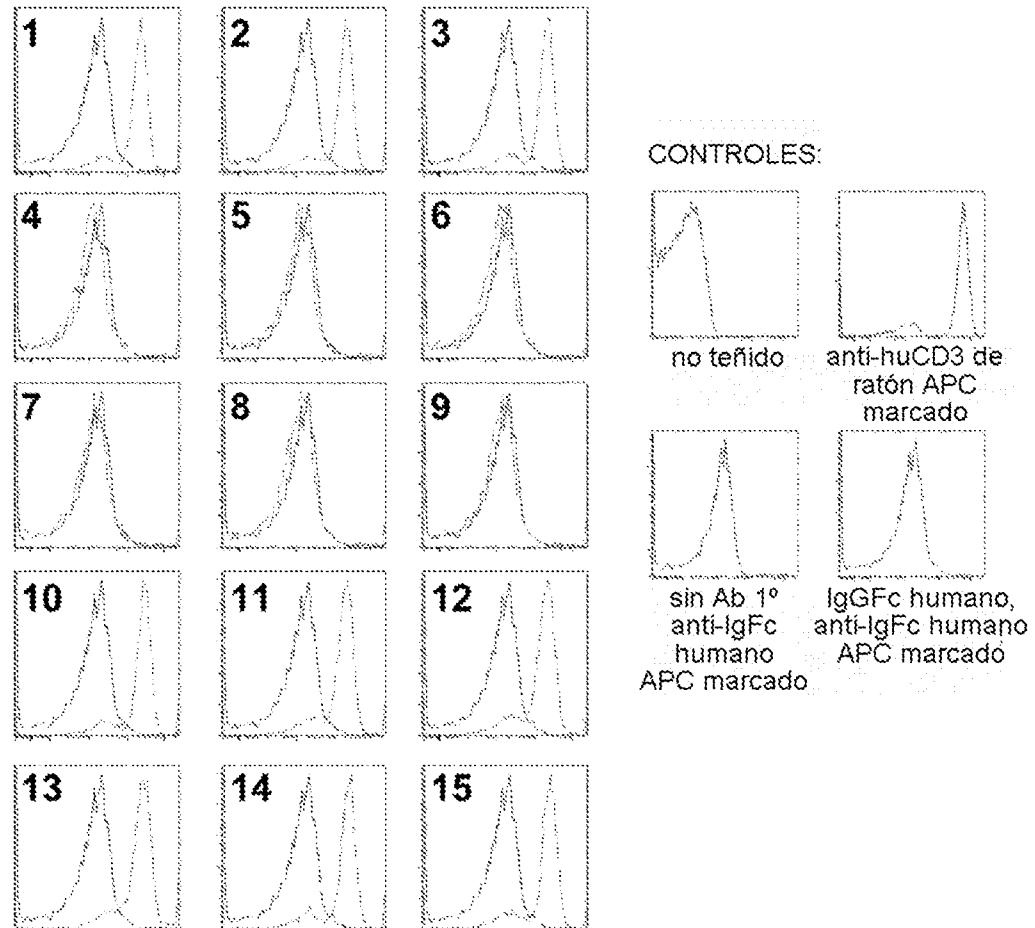


Figura 29

Las diluciones cuádruples en serie de reactivos de Ab NI-0401 (1-15) se probaron para determinar su capacidad para unirse a las PBMC (a  $2,5 \times 10^5$ /muestra)

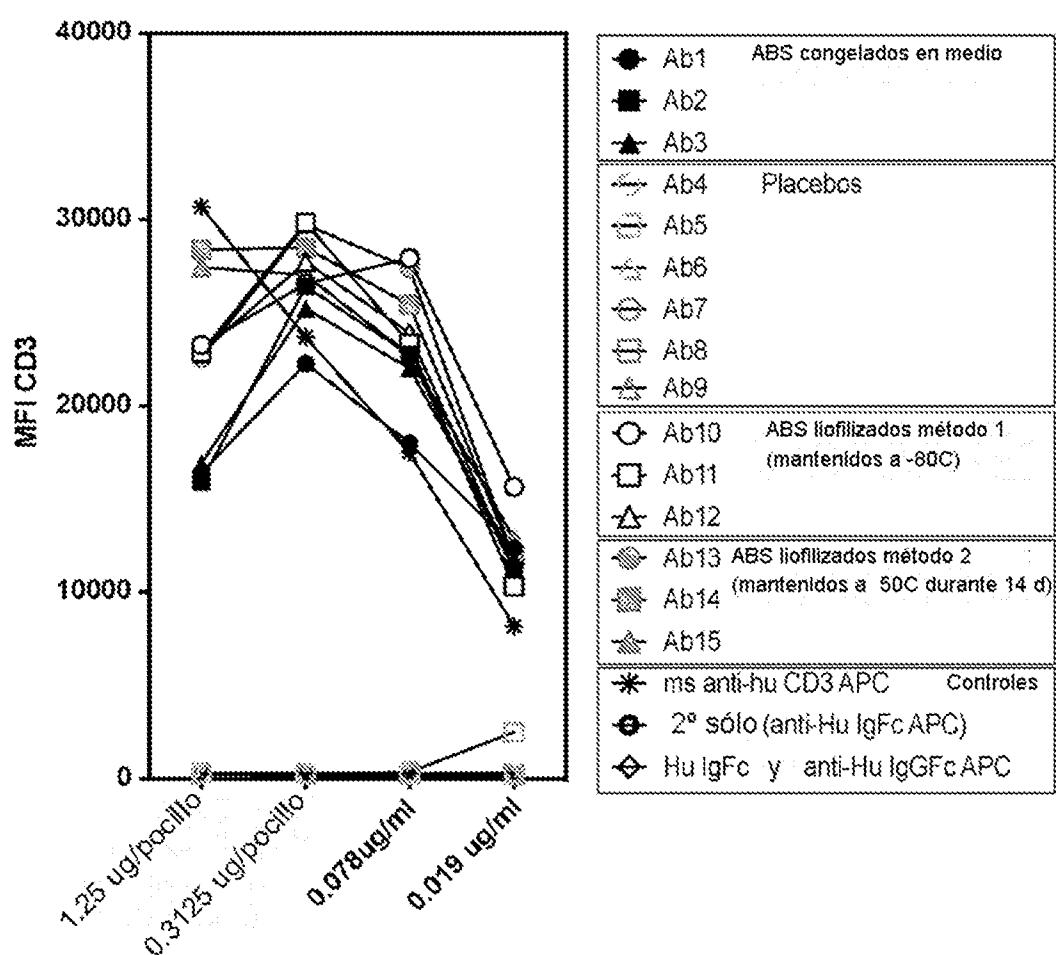
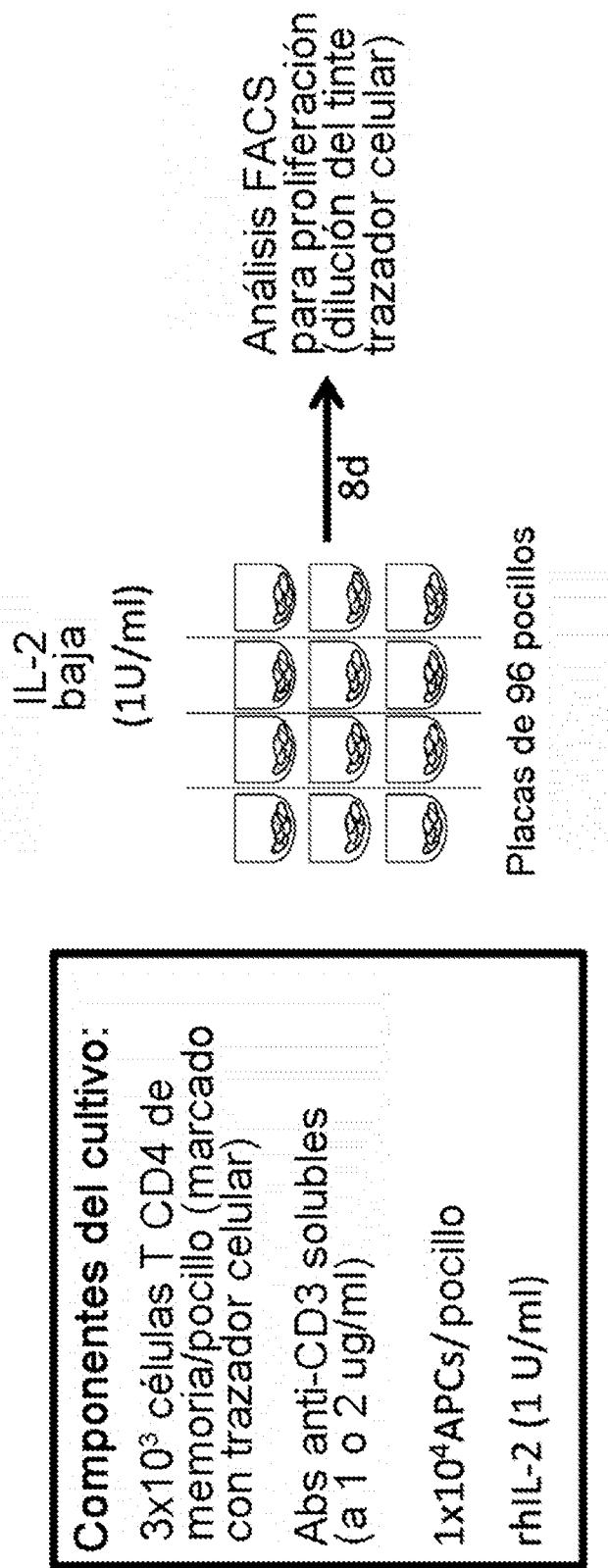


Figura 30



APCs = PBMC autólogas  
sin células T, irradiadas,

Figura 31

Anticuerpos líquidos congelados (dejados a RT antes de la congelación)

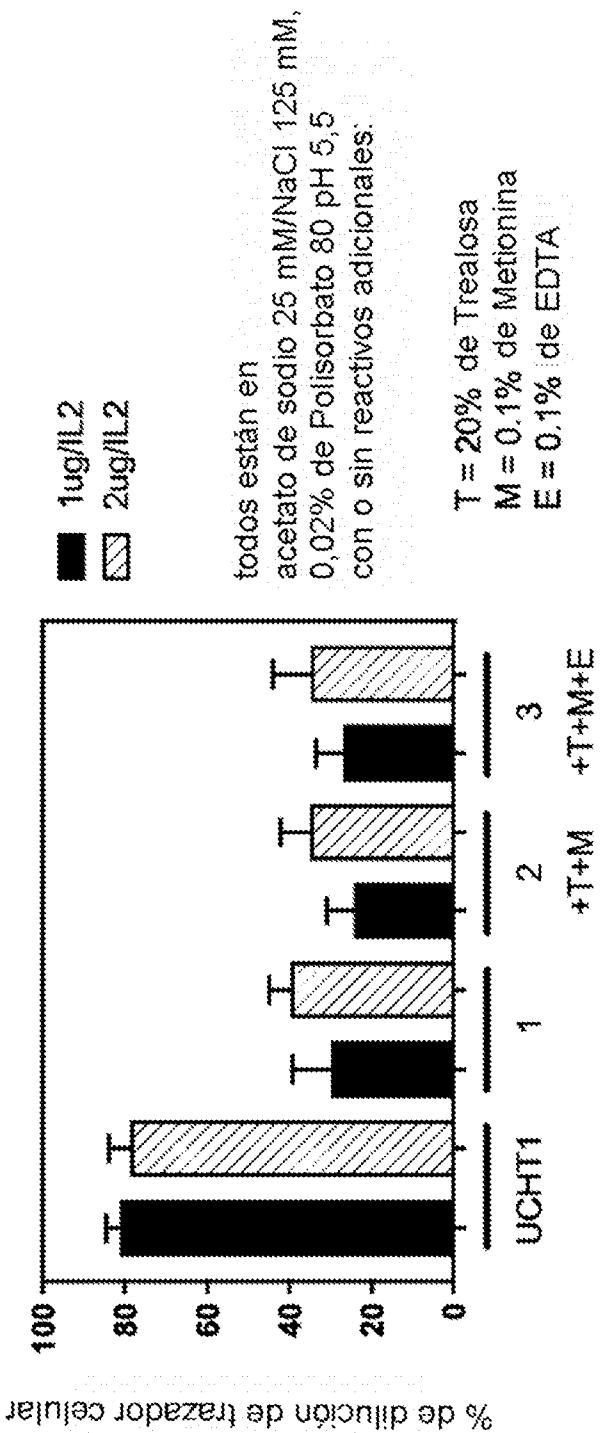


Figura 32

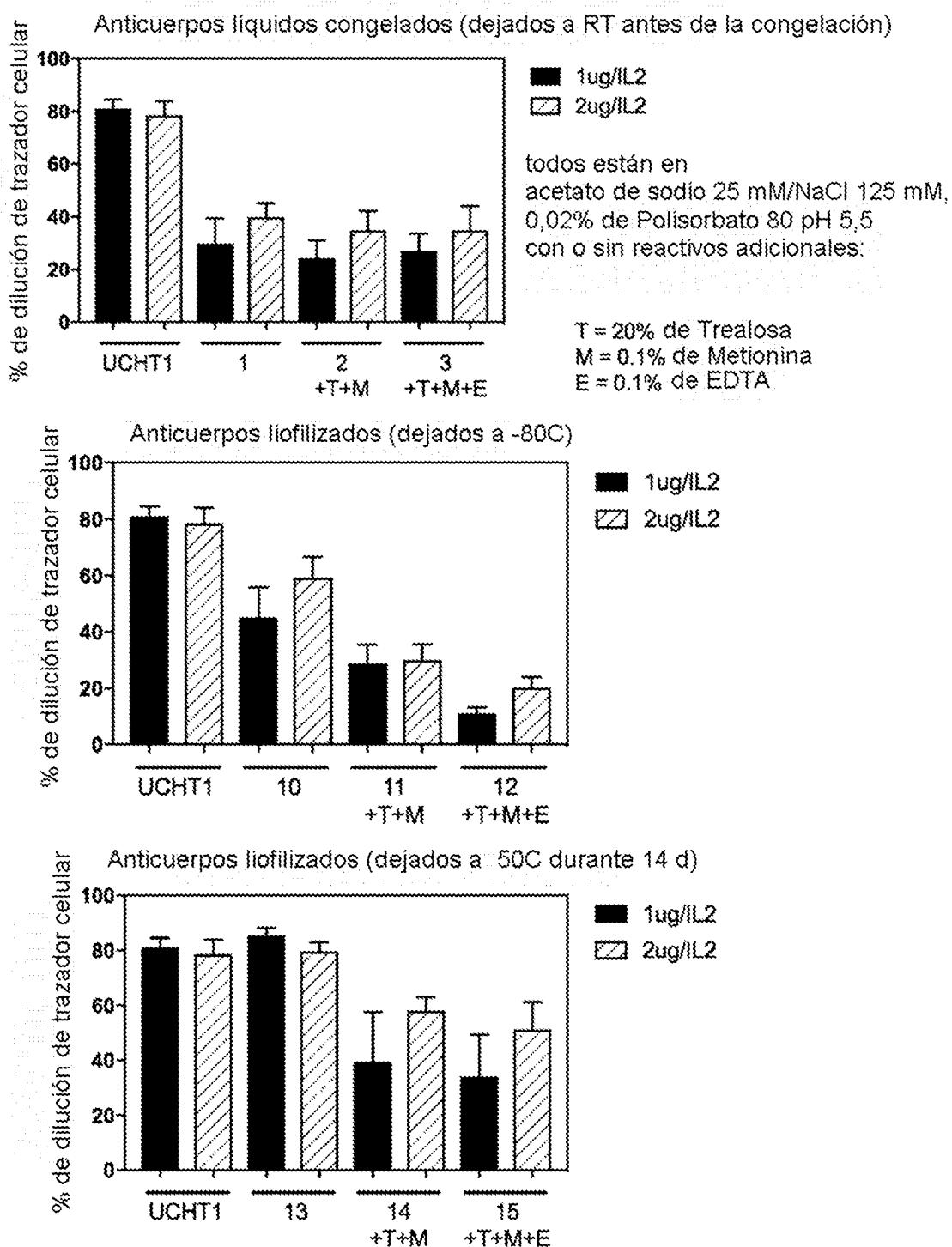


Figura 33

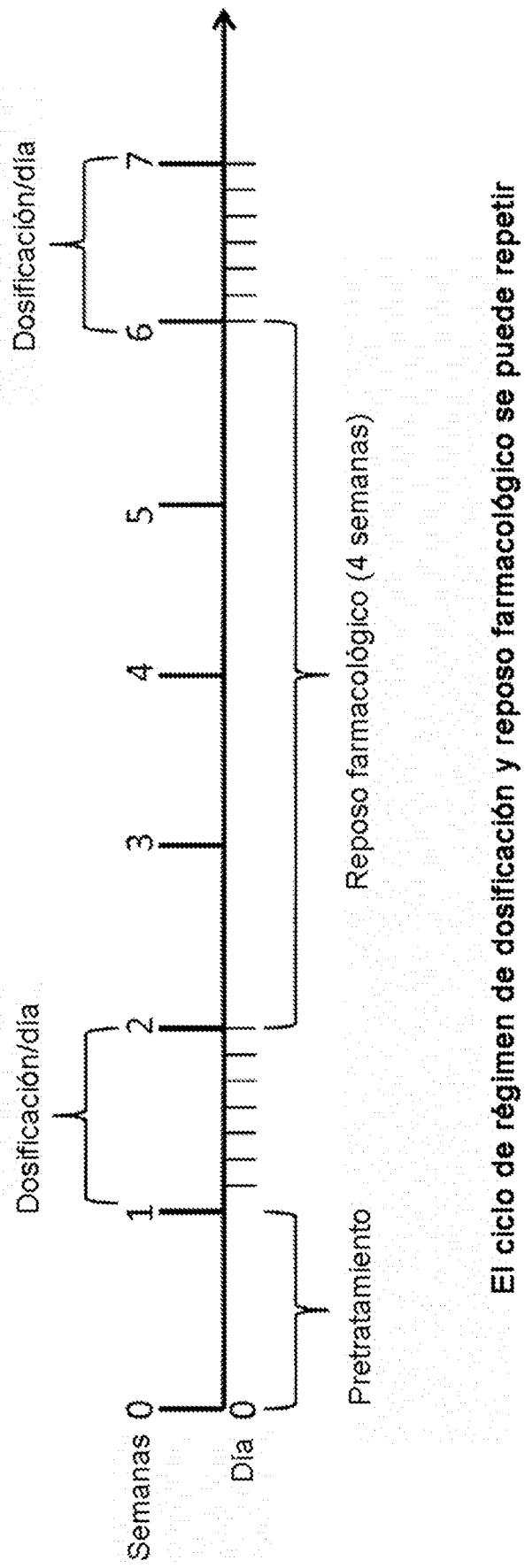
Régimen de dosificación

Figura 34

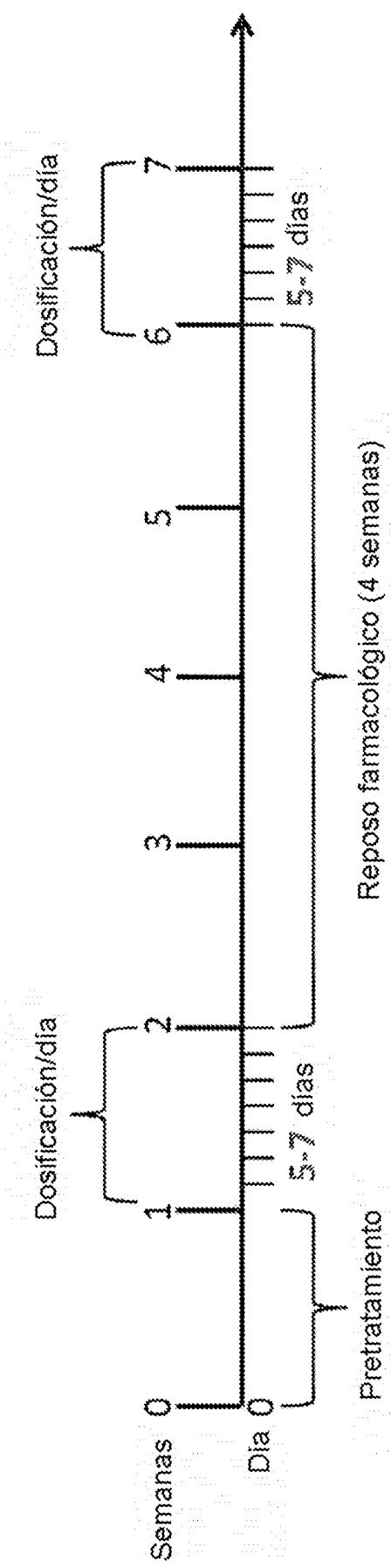


Figura 35

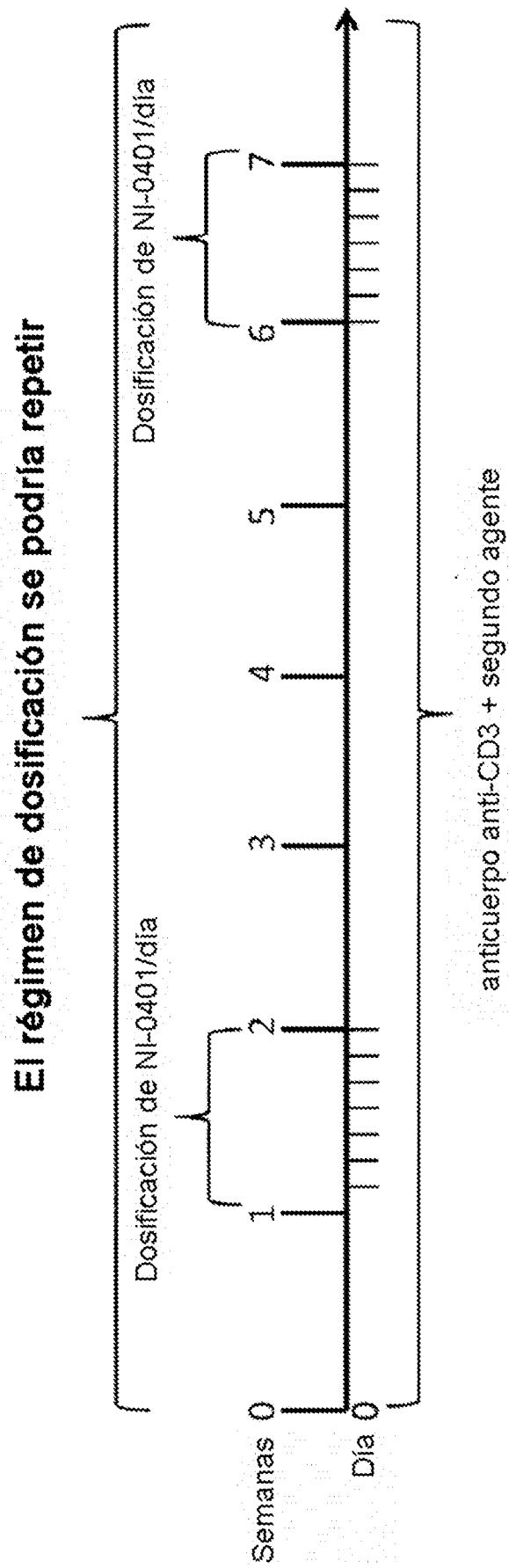


Figura 36

El régimen de dosificación se podría repetir

