

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **017994**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2013.04.30

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)

(21) Номер заявки
201070105

(22) Дата подачи заявки
2008.07.03

(54) **КОМПОЗИЦИИ АНТИТЕЛ**

(31) **60/948,220**

(56) US-A1-20060246004

(32) **2007.07.06**

US-A-4816401

(33) **US**

US-A1-20060121032

(43) **2010.08.30**

(86) **PCT/US2008/069125**

(87) **WO 2009/009407 2009.01.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЛЭКСОСМИТКЛАЙН ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
**Брисбейн Чарлин Е., Кеткар Амол
Шарад (US), Лашмар Улла Тове (GB)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к композициям антител, устойчивым к механическому и температурному воздействию, которые более стабильны, чем стандартная композиция (такая как 30 мМ цитрат, 100 мМ NaCl, pH 6,5). Антитела, согласно настоящему изобретению устойчивые к механическому и температурному воздействию, демонстрируют уменьшенное осаждение в стрессовых условиях, а стандартная композиция агрегирована. Этот результат является неожиданным, так как термодинамически две композиции схожи, как можно видеть из профилей DSC (ДСК) (дифференциального сканирующего калориметра).

017994

B1

017994

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к композициям антител, устойчивым к механическому и температурному воздействию.

Уровень техники

Белки являются более крупными и более сложными, чем традиционные органические и неорганические лекарственные средства (т.е. имеют многочисленные функциональные группы в добавление к сложным трехмерным структурам), и получение указанных белков связано с определенными проблемами. Для того, чтобы белок сохранил биологическую активность, композиция должна сохранять неизменной конформационную целостность по меньшей мере коровой последовательности аминокислот белка, в тоже время защищая множественные функциональные группы от разрушения. Пути деградации белков могут включать химическую нестабильность (т.е. какой-либо процесс, который включает модификацию белка, разрывом связи, проводящим к образованию новой химической молекулы) или физическую нестабильность (т.е. изменениями структуры белка более высокого порядка). Химическая нестабильность может являться результатом дезаминирования, рацемизации, гидролиза, окисления, бета-элиминирования или дисульфидного обмена. Физическая нестабильность может быть вызвана, например, денатурацией, агрегацией, осаждением или адсорбцией. Три основных пути разрушения белка представляют собой агрегацию, дезаминирование и окисление белка. Cleland et al. *Critical reviews in Therapeutic Drug Carrier systems* 10 (4): 307-377 (1993).

Молекула CD20 (также называемая, антиген, ограничивающий дифференцировку человеческих В-лимфоцитов или Vp35) представляет собой гидрофобный трансмембранный белок с молекулярной массой приблизительно 35 kD, расположенный на пре-В и зрелых В-лимфоцитах (Valentine et al. (1989) *J. Biol.Chem.* 264(19) :11282-11287; и Einfield et al. (1988) *EMBO J.* 7(3):711-717). CD20 обнаружены на поверхности более чем 90% В-клеток из периферической крови или лимфоидных органов, и экспрессированы в течение раннего развития пре-В клеток и сохраняются до клеточной дифференцировки плазмочитов. CD20 представлены и на нормальных В-клетках, и на злокачественных В-клетках. В частности, CD20 экспрессированы на более чем 90% В-клеток неходжкинской лимфомы (NHL) (Anderson et al. (1984) *Blood* 63(6):1424-1433), но не обнаружены на гемопоэтических стволовых клетках, про-В клетках, нормальных плазматических клетках или других нормальных тканях (Tedder et al. (1985) *J. Immunol.* 135(2): 973-979).

85 аминокислотных карбоксиконцевых областей CD20 белка расположены в цитоплазме. Длина указанной области отличается от длины других специфических для В-клеток поверхностных структур, таких как тяжелые цепочки IgM, IgD и IgG-цепочки антигенов гистосовместимости класса II альфа или бета, которые имеют относительно короткие интрацитоплазматические области 3,3, 28, 15 и 16 аминокислот, соответственно (Komaromy et al. (1983), *NAR* 11:6775-6785). Из 61 карбоксиконцевых аминокислот, 21 представляет собой кислые остатки, тогда как только 2 представляют собой основные, выявляя, что указанная область имеет сильный отрицательный заряд. No. Регистрации GenBank NP. Sub.-690605.

Считается, что CD20 могут участвовать в регуляции раннего этапа (этапов) в процессах активации и дифференцировки В-клеток (Tedder et al, (1986), *Eur. J. Immunol.* 16:881-887) и могут действовать в качестве кальциевого ионного канала (Tedder et al. (1990) *J. Cell. Biochem.* 14D:195).

Несмотря на неясность относительно реальной функции CD20 в усилении пролиферации и/или дифференцировки В-клеток, они предоставляют важную цель для терапии, опосредованной антителами, для контроля или уничтожения В-клеток, участвующих в механизме раковых заболеваний и аутоиммунных нарушений. В частности, экспрессия CD20 на опухолевых клетках, например, NHL, делает их важной мишенью для терапии, опосредованной антителами, для специфических целевых лекарственных средств против CD20-позитивных неопластических клеток.

HuMax-CD20TM (офатумумаб), описанный как 2F2 антитело в Международном Патенте 2004/035607, представляет собой полный человеческий IgG1, высокоаффинное антитело, направленное на молекулу CD20 в клеточной мембране В-клеток. HuMax-CD20TM представляет собой клиническую разработку для лечения неходжкинской лимфомы (NHL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL) и ревматоидного артрита (RA). См. также Teeling et al., *Blood*, 104, стр. 1793 (2004) и Teeling et al., *J. Immunology*, 177, стр. 362-371(2007).

Существует необходимость для получения устойчивой к механическому и температурному воздействию фармацевтической композиции, содержащей антитело, которая подходит для терапевтического применения. В одном варианте осуществления антитело может быть моноклональным антителом. В другом варианте осуществления антитело может быть анти-CD20 антителом, включая, но не ограничиваясь перечисленным, офатумумаб, ритуксимаб, тозитумомаб, окрелизумаб (2H7. v16), 11B8 или 7D8 (раскрыты в Международном Патенте 2004/035607), анти-CD20 антителом, раскрытым в WO 2005/103081, таким как C6, анти-CD антителом, раскрытым в WO 2003/68821, таким как IMMU-106 (из Immunomedics), анти-CD20 антителом, раскрытым в WO 2004/103404, таким как AME-133 (из Applied Molecular Evolution/Lilly), и анти-CD20 антителом, раскрытым в Патенте США 2003/0118592, таким как TRU-015 (из Trubion Pharmaceuticals Inc).

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к водной композиции антител, устойчивой к механическому и температурному воздействию.

Рамки настоящего изобретения не ограничены отдельными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Более того, различные модификации настоящего изобретения, в дополнение к описанным в данном документе, станут понятны специалисту в области техники из описания, приведенного далее. Указанные модификации полностью находятся в рамках формулы изобретения.

Хотя один вариант осуществления адаптирован к композиции полноразмерного анти-CD20 антитела, оно может быть также использовано для композиции антител других классов, например поликлональных антител, или фрагментов моноклональных или поликлональных антител.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, содержащей терапевтически эффективное количество анти-CD20 антител, в котором композиция дополнительно содержит от 10 до 100 мМ ацетата натрия, от 25 до 100 мМ хлорида натрия, от 0,5 до 5% свободного основания аргинина, от 0,02 до 0,2 мМ EDTA, от 0,01 до 0,2% полисорбата 80 и pH которой скорректирован до значения от 5,0 до 7,0.

В другом варианте осуществления изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, содержащей анти-CD20 антитела в концентрации 20-300 мг/мл, в котором композиция дополнительно содержит 50 мМ ацетата натрия, 51 мМ хлорида натрия, 1% свободного основания аргинина, 0,05 мМ EDTA, 0,02% полисорбата 80 и pH которой скорректирован до 5,5. В еще одном варианте осуществления антитело представляет собой фрагмент анти-CD20 антитела, такого как фрагмент моноклонального антитела. Предпочтительным антителом анти-CD20 является офатумумаб.

В одном варианте осуществления изобретение относится к композиции офатумумаба, содержащей терапевтически эффективное количество офатумумаба, в котором композиция дополнительно содержит от 10 до 100 мМ ацетата натрия, от 25 до 100 мМ хлорида натрия, от 0,5 до 5% свободного основания аргинина, от 0,02 до 0,2 мМ EDTA, от 0,01 до 0,2% полисорбата 80 и pH которой скорректирован до значения от 5,0 до 7,0.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к композиции офатумумаба, содержащей офатумумаб в концентрации 20-300 мг/мл, в котором композиция дополнительно содержит 50 мМ ацетата натрия, 51 мМ хлорида натрия, 1% свободного основания аргинина, 0,05 мМ EDTA, 0,02% полисорбата 80 и pH которой скорректирован до 5,5.

В еще одном варианте осуществления, изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в котором композиция стабильна в течение по меньшей мере 2 лет. В другом варианте осуществления, изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в котором композиция стабильна при температурах до по меньшей мере 55°C. В еще одном варианте осуществления, изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в котором композиция стабильна при температуре приблизительно 5°C в течение по меньшей мере 2 лет. В другом варианте осуществления, изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в котором композиция стабильна при температуре приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 3 месяцев. В другом варианте осуществления изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в котором композиция стабильна при температуре приблизительно 40°C в течение по меньшей мере 1 месяца. В другом варианте осуществления, изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в котором композиция стабильна при температуре приблизительно 55°C в течение по меньшей мере 1 дня. В другом варианте осуществления изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в котором композиция стабильна при температуре приблизительно от 5 до 25°C, от 5 до 35°C, от 5 до 45°C, от 10 до 25°C, от 10 до 35°C, от 10 до 45°C, от 10 до 55°C, от 20 до 35°C, от 20 до 45°C, от 20 до 55°C в течение по меньшей мере 1 дня при встряхивании.

В другом варианте осуществления изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в которой ацетат натрия представлен в количестве приблизительно 50, 40, 45, 55 или 60 мМ. В других вариантах осуществления ацетат натрия может быть представлен в количестве от 10 до 100 мМ, от 20 до 100 мМ, от 30 до 100 мМ, от 40 до 100 мМ, от 50 до 100 мМ, от 60 до 100 мМ, от 70 до 100 мМ, от 25 до 80 мМ или от 30 до 70 мМ.

В еще одном варианте осуществления pH может быть скорректирован до pH 5,0, 6,0, 6,5 или 7,0. В других вариантах осуществления изобретения NaOH или HCl используют для коррекции pH до 5,0, 6,0, 6,5 или 7,0.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в которой хлорид натрия представлен в количестве приблизительно 51, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 53, 54, 55 мМ. В других вариантах осуществления хлорид натрия может быть представлен в количестве от 25 до 100, от 35 до 90 мМ, от 45 до 80 мМ, от 25 до 70 мМ, или от 45 до 70 мМ.

В другом варианте осуществления изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в которой свободное основание аргинина представлено в количестве приблизительно 1, 0,7, 1,3 или 2,0%. В других вариантах изобретения свободное основание аргинина может быть представлено от 0,5 до 5,0%, от 0,5 до 2,0%, от 0,5 до 2,5%, от 0,5 до 3,0%, от 0,5 до 3,5%, от 0,5 до 4,0%, или от 0,5 до 4,5%.

В другом варианте осуществления изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в которой EDTA представлен в количестве приблизительно 0,05, 0,03, 0,04 или 0,06 мМ. В других вариантах осуществления EDTA может быть представлен в количестве 0,02-0,2 мМ, 0,02-0,1 мМ, 0,02 мМ-0,15 мМ, 0,04-0,1 мМ, 0,03-0,15 мМ или 0,03-0,2 мМ.

В другом варианте осуществления изобретение относится к композиции анти-CD20 антител, в которой полисорбат 80 представлен в количестве, приблизительно 0,02, 0,015 или 0,025%. В других вариантах осуществления полисорбат 80 может быть представлен в количестве 0,01-0,2%, 0,01-0,15%, 0,02-0,2%, 0,02-0,15%, 0,01-0,25% или 0,01-0,05%.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу лечения заболевания, в котором задействованы клетки, экспрессирующие CD20, путем введения млекопитающему композиции анти-CD20 антител согласно настоящему изобретению, содержащей терапевтически эффективное количество антител анти-CD20, в которой композиция дополнительно содержит от 10 до 100 мМ ацетата натрия, от 25 до 100 мМ хлорида натрия, от 0,5 до 5% свободного основания аргинина, от 0,02 до 0,2 мМ EDTA, от 0,01 до 0,2% полисорбата 80 и с рН, скорректированным до значений от 5,0 до 7,0. Типичные "заболевания, в которых задействованы клетки, экспрессирующие CD20", которые могут быть подвергнуты лечению (например, смягчены) или профилактике, включают, но не ограничиваются перечисленным, опухолевые заболевания и иммунные заболевания, например аутоиммунные заболевания. Примеры опухолевых заболеваний, которые могут быть подвергнуты лечению и/или профилактике, включают В-клеточную лимфому, например, NHL, хронический лимфобластный лейкоз/лимфому из предшественников В-клеток и опухоли из зрелых В-клеток, такие как В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/ мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (SLL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазматическая лимфома, лимфома из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярная лимфома (FL), включая низкодифференцированную, среднедифференцированную и высокодифференцированную FL, кожную лимфому из клеток фолликулярного центра, В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (MALT тип, узловой или селезеночный тип), волосатоклеточный лейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома Беркитта, плазмочитома, миеломная болезнь, посттрансплантационный лимфопролиферативный синдром, макроглобулинемию Валденстрема, анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL). Примеры иммунных нарушений, в которых задействованы В-клетки, экспрессирующие CD20, которые могут быть подвергнуты лечению и/или профилактике, включают псориаз, псориагический артрит, дерматит, системную склеродермию и склероз, воспалительные заболевания кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, респираторный дистресс синдром, менингит, энцефалит, увеит, гломерулонефрит, экзему, астму, атеросклероз, нарушение адгезии лейкоцитов, рассеянный склероз, синдром Рейно, синдром Шегрена, ювенильный диабет, синдром Рейтера, синдром Бехчета, иммунокомплексный нефрит, IgA нефропатия, IgM полинейропатия, иммуно-опосредованная тромбоцитопения, такая как острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура и хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическая анемия, миастения гравис, волчаночный нефрит, системная красная волчанка, ревматоидный артрит (РА), атопический дерматит, пузырчатка, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, грануломатоз Вегенера, синдром Оменна, хроническую почечную недостаточность, острый инфекционный мононуклеоз, ВИЧ, и заболевания, связанный с вирусом герпеса. Дополнительные примеры представляют собой тяжелый респираторный дистресс-синдром и хореоретинит. Другие дополнительные примеры представляют собой заболевания и расстройства, вызванные инфицированием В-клеток вирусом, таким как вирусом Эпштейн-Барра (ЭБВ). Также дополнительным примером является ХОБЛ.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения заболевания, в котором задействованы клетки, экспрессирующие CD20, путем введения млекопитающему композиции анти-CD20 антител согласно настоящему изобретению, содержащей терапевтически эффективное количество антител анти-CD20, в которой композиция дополнительно содержит от 10 до 100 мМ ацетата натрия, от 25 до 100 мМ хлорида натрия, от 0,5 до 5% свободного основания аргинина, от 0,02 до 0,2 мМ EDTA, от 0,01 до 0,2% полисорбата 80 и с рН, скорректированным до значений от 5,0 до 7,0 и в котором устойчивую композицию антител вводят млекопитающему перорально, парентерально, интраназально, вагинально, ректально, лингвально, сублингвально, буккально, черескожно, внутривенно или подкожно.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения заболевания, в котором задействованы клетки, экспрессирующие CD20, путем введения млекопитающему композиции анти-CD20 антител согласно настоящему изобретению, содержащей анти-CD20 антитела в концентрации 20-300 мг/мл, в которой композиция дополнительно содержит 50 мМ ацетата натрия, 51 мМ хлорида натрия, 1% свободного основания аргинина, 0,05 мМ EDTA, 0,02% полисорбата 80 и рН которой скорректирован до 5,5. Предпочтительное анти-CD20 антитело представляет собой офатумумаб.

Понятно, что и описанная ранее сущность изобретения и приведенное далее подробное описание являются примерными и поясняющими и предназначены дополнительно объяснять заявленное изобретение.

Сопровождающие чертежи предоставлены для дополнительного понимания изобретения и состав-

ляют часть настоящего описания, иллюстрируют некоторые варианты осуществления и совместно с описанием служат для пояснения принципов изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 иллюстрирует стандартную композицию (RefMat) анти-CD20 антитела 20 мг/мл (30 мМ цитрат, 100 мМ NaCl, pH 6,5) в двух экземплярах.

Фиг. 2 иллюстрирует один вариант осуществления композиции анти-CD20 антител по изобретению (PlatForm) 20 мг/мл (50 мМ ацетата натрия, хлорида натрия (51 мМ), 1% свободного основания аргинина, 0,05 мМ EDTA, 0,02% полисорбата 80 и pH скорректированным до 5,5 HCl) в двух экземплярах.

Фиг. 3 графически иллюстрирует сравнение устойчивости анти-CD20 антитела к температуре в композиции по изобретению (PlatForm) и стандартных буферов композиции (PlatForm) DSC. Термодинамически, две композиции похожи, как видно из их DSC профилей, так как изменения в видимой Tm меньше, чем 0,5°C между композициями.

Подробное описание изобретения

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к композициям антител, устойчивым к механическому и температурному воздействию.

В другом варианте осуществления изобретение обеспечивает неожиданную устойчивость, проявляемую композицией при одновременных стрессовых условиях повышенной температуры и встряхивания при 55°C.

Дополнительный вариант изобретения представляет собой более стабильную композицию по сравнению со стандартной композицией (такой как 30 мМ цитрата, 100 мМ NaCl, pH 6,5). Композиция согласно настоящему изобретению демонстрировала уменьшенное осаждение (оставалась прозрачной) при воздействии стрессовых условий, а стандартная композиция была агрегирована. Этот результат был непредсказуем, так как термодинамически две композиции являются схожими, как видно из профилей ДСК (дифференциальной сканирующей калориметрии).

В описании настоящего изобретения некоторые термины использованы согласно приведенному ниже определению.

Термин "белковая композиция" или "композиция антител" означает композиции, которые представлены в такой форме, которая позволяет эффективность биологического действия активных ингредиентов, и которые не содержат дополнительных компонентов, токсичных для пациентов, которым вводят композицию.

"Фармацевтически приемлемые" вспомогательные вещества (носители, добавки) представляют собой те вспомогательные вещества, которые могут быть введены млекопитающему для предоставления эффективной дозы используемого активного ингредиента. Например, концентрация вспомогательного вещества также важна для возможности применять композицию в качестве инъекции.

"Стабильная" композиция представляет собой композицию, в которой белок в основном сохраняет свою физическую и/или химическую стабильность и/или биологическую активность при хранении. Различные методики анализа для измерения стабильности белков доступны в области техники и рассмотрены в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк, N.Y., Pubs (1991) and Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993), например. Стабильность может быть оценена при определенной температуре в течение определенного периода времени. Предпочтительно композиция стабильна при температуре окружающей среды или при 40°C в течение по меньшей мере 1 месяца и/или стабильна при 2-8°C по меньшей мере в течение от 1 до 2 лет. Более того, желательно, чтобы композиция была стабильна при замораживании (например, до -70°C) и оттаивании продукта.

Белок "сохраняет свою физическую стабильность" в биофармацевтической композиции, если он демонстрирует незначительные или отсутствие изменений в агрегации, осаждении и/или денатурации, что регистрируется визуальным наблюдением цвета и/или прозрачности, или измеряют рассеиванием УФ-излучения (оценивают видимые агрегаты) или эксклюзионной хроматографией (SEC). SEC оценивает растворимые агрегаты, которые не обязательно являются предшественниками видимых агрегатов.

Белок "сохраняет свой химическую стабильность" в биофармацевтической композиции, если химическая стабильность при данном времени такая, что белок сохраняет свою биологическую активность в соответствии с определением, приведенным далее. Химически деградировавшие виды могут быть биологически активными и химически нестабильными. Химическая стабильность может быть исследована определением и количественным подсчетом химически поврежденных форм белка. Химическое повреждение может включать изменение размера (например, клиппинг), которое может быть оценено используя SEC, SDS-PAGE и/или времяпролетную масс-спектрометрию с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI/TOF MS), например. Другие типы химического повреждения включают изменение заряда (например, появляющееся в результате дезаминирования), которое может быть оценено ионообменной хроматографией, например.

Антитело "сохраняет свою биологическую активность" в фармацевтической композиции, если изменение в биологической активности антитела за определенное время в пределах 10% (в пределах погрешности измерения) биологической активности, проявляемой фармацевтической композицией при

получении, что определяют в исследовании связывания антигена, например. Другие исследования "биологической активности" для антител представлены в данном документе далее.

Термин "изотонический" означает, что композиция имеет, по существу, такое же осмотическое давление, как и человеческая кровь. В одном варианте осуществления изобретения изотонические композиции по изобретению в общем случае имеют осмотическое давление от 250 до 350 мосм. В других вариантах осуществления изотонические композиции по изобретению имеют осмотическое давление от приблизительно 350 до 4,50 мосм. В еще одном варианте осуществления осмотическое давление составляет более 450 мосм. Изотоничность можно измерить, например, используя парофазный или криоскопический тип осмометра.

В рамках изобретения "буфер" относится к буферному раствору, который сопротивляется изменению pH, действием компонентов связанного кислоты-основания. В одном варианте осуществления буфер согласно настоящему изобретению имеет pH от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,0; в другом варианте осуществления от приблизительно 4,8 до приблизительно 5,8; и в дополнительном варианте осуществления pH приблизительно 5,5. Примеры буферов, которые будут контролировать pH в этом интервале, включают ацетат (например, ацетат натрия), сукцинат (такой как сукцинат натрия), глюконат, гистидин, цитрат и другие органические кислые буфера. Если необходима композиция, устойчивая к замораживанию-размораживанию, буфер предпочтительно не является фосфатом.

С точки зрения фармакологии, в контексте настоящего изобретения "терапевтически эффективное количество" антител означает количество, эффективное в предупреждении или лечении расстройства, для лечения которого антитела эффективны. "Нарушение" представляет собой какое-либо состояние, которое успешно лечится антителами. Указанное нарушение включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающее к нарушению, о котором идет речь. В предпочтительном варианте осуществления "нарушение" представляет собой заболевание, в котором задействованы клетки, экспрессирующие CD20.

"Консервант" представляет собой соединение, которое может быть включено в композицию для существенного уменьшения действия бактерий, таким образом, способствуя получению многоцелевой композиции, например. Примеры возможных консервантов включают октадецилдиметилбензил хлорид аммония, гексаметионий хлорид, бензалконий хлорид (смесь алкилбензилдиметиламмония хлоридов, в которых алкильные группы представляют собой длинноцепочечные соединения) и хлорид бензалкония. Другие типы консервантов включают ароматические спирты, такие как феноловый, бутиловый и бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексан, 3-пентан и м-крезол. Наиболее предпочтительный консервант согласно настоящему изобретению представляет собой бензиловый спирт.

Термин "антитело" использован в широком смысле и охватывает моноклональные антитела (включая полноцепочечные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), и фрагменты антител такой длины, до которой они проявляют требующуюся биологическую активность.

"Фрагменты антитела" включают часть полноцепочечного антитела, в общем случае, антиген-связывающую или ее различные области. Примеры фрагментов антител включают Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты; диантитела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин "моноклональное антитело" в рамках изобретения относится к антителу, полученному из популяции, по существу, моноклональных антител, т.е. отдельных антител, содержащихся в популяции, которые являются одинаковыми, исключая возможные, естественно возникающие мутации, которые могут быть представлены в минимальном количестве. Моноклональные антитела высоко специфичны, направлены на единственный участок антигена. Более того, в отличие от общепринятого (поликлонального) антитела, композиции, которые обычно включают различные антитела, направленные на различные детерминанты (эпитопы), каждое моноклональное антитело направлено против единственного определенного участка на антигене. Определение "моноклональный" выявляет характерные особенности антитела, то, что его получают, в основном, из популяции моноклональных антител, и не должен пониматься, как требующий получения каким-либо отдельным способом. Например, моноклональные антитела, используемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены гибридомным способом, впервые описанным Kohler et al., Nature 256:495 (1975), или могут быть получены способами рекомбинантной ДНК (см., например, Патент США No. 4816567). "Моноклональные антитела" могут быть также выделены из банка фаговых антител, используя методику, описанную в Clackson et al., Nature 352^624-626 (1991) и Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597(1991), например.

"Гуманизированные" формы не относящихся к человеческим антител (например, мышинных) представляют собой химерические антитела, которые содержат минимальные последовательности, полученные из иммуноглобулина, не относящегося к человеческому. В основном, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из гипервариабильной области реципиента заменены остатками из гипервариабильной области видов, не относя-

щихся к человеку (антитело-донор), таких как мыши, крысы, кролики или человекообразные приматы, имеющими необходимую специфичность, аффинитет и функциональные возможности. В некоторых примерах FR остатки человеческого иммуноглобулина замещают соответствующими остатками иммуноглобулина, видов, отличных от человека. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаружены в реципиентном антителе или в донорском антителе. Указанные модификации получены для дополнительного точного представления антитела. В общем случае, в основном все гуманизированные антитела содержат по меньшей мере одно и обычно два различных домена, в которых все или большинство гипервариабельных областей соответствуют гипервариабельным областям иммуноглобулина, не относящегося к человеческому, и все или большинство FR участков представляют собой последовательности иммуноглобулина человека.

Гуманизированное антитело необязательно также содержит по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Подробнее см. Jones et al. *Nature* 321:522-525 (1986); Riechma, n-n et al., *Nature* 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

"Одноцепочечный Fv" или "sFv" фрагменты антител, содержащие V_H и V_L домены антитела, в которых указанные домены представляют собой одну полипептидную цепь. В общем случае, Fv полипептид дополнительно содержит полипептидный линкер между V_H и V_L доменами, которые дают возможность SFv образовывать желаемую структуру для связывания антигена. В отношении sFv см. Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, N.Y., стр. 269-315 (1994).

Термин "диатело" относится к небольшим фрагментам антител с двумя антигенсвязывающими центрами антитела, которые содержат тяжелую цепь вариабельного домена (V_H), соединенную с легкой цепью вариабельного домена (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H и V_L). Используя линкер, который слишком короткий для объединения двух доменов на одной и той же цепи, домены вынуждены объединяться с комплементарным доменом другой цепи и создавать два антигенсвязывающих центра антитела.

Диатела более подробно описаны, например, в EP 404097; WO 93/11161 и Holinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. США* 90: 6444-6448 (1993).

Выражение "линейное антитело", использованное на протяжении всей заявки, относится к антителам, описанным в Zarata et al., *Protein Eng.* 8 (10): 1,057-1062 (1995). Кратко, указанные антитела содержат пару объединенных Fd сегментов (V_H - C_H - V_{H1} - C_{H1}), которые образуют пару антигенсвязывающих центров антитела. Линейные антитела могут быть биспецифическими и моноспецифическими.

Полученное антитело предпочтительно в основном не содержит примесей и желателно, по существу, является моноклональным (т.е. свободно от загрязнения белками и т.д.). Антитело "в основном не содержащее примесей" означает композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 90 мас.% антител, исходя из общей массы композиции, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95 мас.%. "По существу моноклональные" антитела означают композицию, содержащую по меньшей мере приблизительно 99 мас.%, антител, исходя из общей массы композиции.

"Лечение" относится к терапевтическому воздействию и профилактическим или предупреждающим мерам. Нуждающиеся в лечении включают и тех пациентов, которые уже имеют нарушение, и тех, у которых нарушение предупреждают.

"Млекопитающее" для целей лечения относится к какому-либо животному, отнесенному к классу млекопитающих, включая, но не ограничиваясь перечисленным, людей, домашних и хозяйственных животных, и животных зоопарков, спортивных и комнатных животных, таких как собаки, лошади, кошки и коровы.

"Стрессовое условие" относится к окружающей среде, которая химически или физически неблагоприятна для белка и может создавать неприемлемую стабильность белка (например, тепловое, механическое, химическое воздействие).

Гель-хроматография представляет собой способ хроматографии, в котором частицы разделяют исходя из их размера или гидродинамического объема.

Динамическое рассеяние света представляет собой способ, который измеряет временную зависимость рассеяния света белком. Обычно указанную временную зависимость подвергают обработке для получения гидродинамического радиуса молекулы.

"DSC" относится к различным сканирующим калориметрам:

DSC параметры съемки могут быть, но не ограничиваются перечисленным, 1 мг/мл белка, сканирование от 5 до 80°C со скоростью сканирования 70°C в 1 ч и 15 мин предварительного ожидания. Сканирование буфер-буфер может быть снято первым и вычтено из данных, не подвергнутых обработке. Данные могут быть скорректированы для буфера и нормализованы для концентрации белка при построении графика. Агрегацию можно предупредить корректировкой линии отсчета.

Приведенные далее примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение. Примеры не предназначены ограничивать рамки настоящего изобретения и предоставлены для дополнительно пояснения изо-

бретения.

Примеры

Изобретение дополнительно иллюстрируют следующими примерами, которые предназначены для пояснения изобретения. Эти примеры не предназначены ограничивать рамки настоящего изобретения. Модификации и изменения настоящего изобретения возможны с точки зрения методик, описанных в данном документе, и, следовательно, находятся в рамках настоящего изобретения. Примеры, приведенные далее, выполняют, используя стандартные методики, и указанные стандартные методики хорошо известны и обычны для специалиста в области техники, исключая те, которые описаны подробно.

Пример 1.1: Получение основного буфера композиции.

В одном варианте осуществления изобретения, получают 4 л ацетатного буфера. В указанном варианте осуществления конечный буфер содержит 50 мМ ацетата натрия, 0,05 мМ EDTA, 51 мМ NaCl, 0,1% аргинина, 0,02% полисорбата 80, pH 5,5. Буфер получают растворением трехводного ацетата натрия, динатрия эдетата (EDTA), полисорбата 80 и свободного основания L-аргинина в 3,5 л деионизированной воды. Когда pH скорректировали до 5,5, используя 3N HCl, объем доводят до 4,0 л и буфер фильтруют, используя 0,45 мкм фильтровальный элемент. Затем буфер можно хранить при 2-8°C до использования. "% композиция, описанный в настоящей заявке, относится к "% объем".

Пример 2.1: Получение офатумумаба в основном буфере композиции.

В одном варианте осуществления изобретения офатумумаб диафильтруют в основную композицию (50 мМ ацетата натрия, 0,05 мМ EDTA, 51 мМ NaCl, 0,02%, полисорбата 80 и 0,1% аргинина (свободное основание)) концентрируют до стабильности. Офатумумаб диафильтруют в основную композицию, используя лабораторную систему фильтрации в поперечном потоке с тремя мембранами. После диафильтрации в основной буфер, офатумумаб концентрируют до максимальной концентрации 179 мг/мл. Весь процесс занимает три рабочих дня до завершения, и выход продукта составляет 96,1%. Некоторую часть разведенной основным буфером композиции так, чтобы концентрация приблизительно составила 20-179 мг/мл, можно исследовать.

Пример 3.1: Получение офатумумаба в стандартной и основной композиции для непосредственного сравнения внешнего вида (ВВ)

Антитело анти-CD20 (офатумумаб) получают в стандартной и основной (один вариант осуществления настоящего изобретения) композиции в концентрации 20 мг/мл для непосредственного сравнения внешнего вида на протяжении 12 недель и для испытаний встряхиванием. Антитело анти-CD20 в стандартной и основной композиции фильтруют, используя низкобелковый связывающий мембранный фильтр 0,2 мкм. После фильтрации каждую композицию разливают по 3 мл в 5 cc флаконы, закрывают пробкой и закупоривают в стерильных условиях под очищающим вытяжным шкафом. Флаконы встряхивают при 325 об./мин при температуре 55°C. Во время встряхивания с нагреванием наблюдают за внешним видом, как описано в примере 3.2, периодически через 42-часовые промежутки времени. Фиг. 1 и 2 демонстрируют стандартную и основную композиции, соответственно, после 18,5 ч встряхивания с нагреванием. Результаты изучения встряхивания выявляют, что стандартная композиция со временем образует частицы при встряхивании при температуре 55°C более быстро, чем основная композиция.

Пример 3.2: GA(внешний вид ВВ), 18,5 ч испытания встряхиванием - внешний вид офатумумаба 20 и 100 мг/мл

Внешний вид (GA, ВВ) образцов анти-CD20, подвергшихся испытанию встряхиванием, представлен в таблице, приведенной далее. Оценку GA(ВВ) выполняют, используя общий способ, который может быть использован для раствора антител IgG, который описывает цвет, прозрачность и видимые частицы вещества.

Момент времени встряхивания	Внешний вид
Исходно	
Стандартная	Прозрачная, бесцветная, представлены 1-2 частицы
Основная	Прозрачная, бесцветная, частиц не содержит
18,5 часов	
Стандартная	Прозрачная, бесцветная, представлены несколько крупных частиц
Основная	Прозрачная, бесцветная, частиц не содержит
9-42 часа	
Стандартная	Мутная, бесцветная, представлены несколько крупных частиц
Основная	Слегка мутная, бесцветная, частиц не содержит

Пример 4. Определить температурную устойчивость раствора офатумумаба в стандартном и основном буфере дифференциальной сканирующей калориметрией (ДСК)

Для правильного осуществления исследования ДСК сканируют один буфер и буфера с белком. Белок в стандартной и основной композиции разводят до 1 мг/мл, как представлено в примере 4.1. Данные получают из показателей DSC для скана при 5-80°C, скорости сканирования 70°C в час с 15-минутной калибровкой перед каждым сканом. Объем клеток образца ДСК (DSC) ~0,5 мл. После того как получили сканы буфера и белка, сканы буфера вычитают из скана белка. Концентрацию белка в образцах получают для внесения поправки на концентрацию в каждом скане (см., пример 4.2). Значения для T_{un} , °C, начала разворачивания, T_m , °C, температуру денатурации (при максимуме транзиции) и $T_{1/2}$, °C, ширина пика на полувысоте (отражает изменения в третичной структуре и кооперативность транзиции) получают для офатумумаба для каждой композиции (см. пример 4.3). Действительные сканы DSC можно видеть на фиг. 3. Исходя из результатов DSC, офатумумаб, или в стандартной композиции, или в основной композиции обладает похожими профилями ДСК и следовательно предположительно имеет схожую температурную устойчивость.

Пример 4.1: Получение образца для биофизических характеристик исследования pH офатумумаба

1. Разведения

pH	Буфер	Начальная концентрация мг/мл	Разведение до 1 мг/мл для ВСК	
			мл образца	мл буфера
6,5 Стандартная композиция	30 мМ цитрата, 100 мМ NaCl	17	0,1	1,6
5,5 Основная композиция	50 мМ ацетата, 51 мМ NaCl, 0,05 мМ EDTA, 1% арг., 0,02% Tween 80	20	0,075	1,43

Пример 4.2: A280

Измерения

pH	Буфер	Начальная концентрация мг/мл	Измеренная конц. разведения 0,5 мг/мл	
			мг/мл	мМ*
6,5 Стандартная композиция	30 мМ цитрата, 100 мМ NaCl	17	0,517	0,00345
5,5 Основная композиция	50 мМ ацетата, 51 мМ NaCl, 0,05 мМ EDTA, 1% арг., 0,02% Tween 80	20	0,444	0,00296

*использование для нормализации ДСК сканов.

Получают один образец, емкость с соответствующим буфером, считывают 3 раза. Используют 1 см кювету. Поглощение субстрата A320 после деления на коэффициент поглощения (1.49).

Пример 4.3: Результаты ДСК

Образец	pH	Буфер	T °C	T °C	T _{1/2} , °C	Замечания
Стандартная композиция	6,5	30 мМ цитрата, 100 мМ NaCl	62	68,8	2,9*	
Основная композиция	5,5	50 мМ ацетата, 51 мМ NaCl, 0,05 мМ EDTA, 1% арг., 0,02% Tween 80	60	68,4	3,2*	Сходно со стандартной композицией

*Значения $T_{1/2}$ определяют вручную

Экзотермический вклад из агрегатов искажает исходную линию, следовательно, указанные значения могут быть искусственно занижены.

В конкретных вариантах осуществления, композиция анти-CD20 антител настоящего изобретения может быть использована для лечения пациента с онкогенными нарушениями, например нарушением, характеризующимся наличием опухолевых клеток, экспрессирующих CD20, включая, например, В-клеточную лимфому, например, NHL. Примеры онкогенных заболеваний, которые могут быть подвергнуты лечению и/или предупреждены, включают В-клеточную лимфому, например NHL, хронический лимфобластный лейкоз/лимфому из предшественников В-клеток и опухоли из зрелых В-клеток, такие как В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома

(SLL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазматическая лимфома, лимфома из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярная лимфома (FL), включая низкодифференцированную, среднедифференцированную и высокодифференцированную FL, кожную лимфому из клеток фолликулярного центра, В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (MALT тип, узловой или селезеночный тип), волосатоклеточный лейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома Беркитта, плазмочитома, миеломная болезнь, посттрансплантационный лимфопролиферативный синдром, макроглобулинемия Валденстрема, анапластическая крупноклеточная лимфома (ALCL).

Дополнительными примерами В-клеточной неходжкинской лимфомы являются лимфоматоидный грануломатоз, первичная экссудативная лимфома, внутрисосудистая В-крупноклеточная лимфома, медиастинальная В-крупноклеточная лимфома, болезни тяжелых цепей (включая гамма-, мю- и альфа-болезни), лимфомы, вызванные терапией иммунодепрессантами, такие как лимфома, вызванная циклоспорином и метотрексатом.

В дополнительном варианте осуществления, композиция анти-CD20 антител настоящего изобретения может быть использована для терапии лимфомы Ходжкина.

Примеры иммунных нарушений (заболеваний), при которых клетки экспрессируют CD20, которые могут быть подвергнуты лечению и/или предупреждены композицией анти-CD20 антител настоящего изобретения, включают аутоиммунные заболевания, такие как псориаз, псориатический артрит, дерматит, системную склеродермию и склероз, воспалительные заболевания кишечника (IBD), болезнь Крона, язвенный колит, респираторный дистресс-синдром, менингит, энцефалит, увеит, гломерулонефрит, экзему, астму, атеросклероз, нарушение адгезии лейкоцитов, рассеянный склероз, синдром Рейно, синдром Шегрена, ювенильный диабет, синдром Рейтера, синдром Бехчета, иммунокомплексный нефрит, IgA нефропатия, IgM полинейропатия, иммуно-опосредованная тромбоцитопения, такая как острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура и хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическая анемия, миастения гравис, волчаночный нефрит, системная красная волчанка, ревматоидный артрит (РА), atopический дерматит, пузырчатка, болезнь Грейвса, тиреоидит Хашимото, грануломатоз Вегенера, синдром Оменна, хроническая почечная недостаточность, острый инфекционный мононуклеоз, ВИЧ, и заболевания, связанные с вирусом герпеса. Дополнительные примеры представляют собой тяжелый респираторный дистресс-синдром и хореоретинит. Другие дополнительные примеры представляют собой заболевания и расстройства, вызванные инфицированием В-клеток вирусом, таким как вирусом Эпштейн-Барра (EBV).

Дополнительные примеры воспалительных, иммунных и/или аутоиммунных нарушений, в которых на первый план выходят аутоантитела и/или излишняя В-лимфоцитарная активность и которые могут быть подвергнуты лечению и/или предупреждены композицией анти-CD20 антител настоящего изобретения, включают следующее:

васкулиты и другие сосудистые нарушения, такие как микроскопический полиангиит, синдром Черджа-Штрауса, и другие АНСА-ассоциированные васкулиты, узелковый полиартериит, эссенциальный криоглобулинемический васкулит, кожный лейкоцитокластический ангиит, болезнь Кавасаки, артериит Такаядзу, гигантоклеточный артрит, болезнь Шенлейн-Геноха, первичный и изолированный церебральный ангиит, узловую эритему, облитерирующий тромбангиит, тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (включая гемолитический уремический синдром) и вторичные васкулиты, включая кожный лейкоцитокластический ангиит (например, вторичный гепатиту В, гепатит С, макроглобулинемия Валденстрема, В-клеточные новообразования, ревматоидный артрит, синдром Шегрена или системная красная волчанка); дополнительные примеры представляют собой узелковую эритему, аллергический васкулит, панникулит, болезнь Кристиана-Вебера, гиперглобулинемическую пурпуру и болезнь Бюргера; кожные нарушения, такие как контактный дерматит, линейный дерматит, связанный с IgA, витилиго, гангренозная пиодермия, врожденная пузырчатка, обыкновенная пузырчатка (включая рубцовую пузырчатку и буллезную пузырчатку), очаговую аллопецию (включая универсальную аллопецию и тотальную аллопецию), герпетический дерматит, мультиформную эритему и хроническую аутоиммунную крапивницу (включая ангионевротический отек и уртикарный васкулит); иммунную цитопению, такую как аутоиммунная нейтропения и аплазия только эритроцитов; болезни соединительной ткани, такие как CNS волчанка, дискоидная красная волчанка, KREST-синдром, смешенные заболевания соединительной ткани, полимиозит/дерматомиозит, миозит с включенными тельцами, вторичный амилоидоз, криоглобулинемия типа I и II, фибромиалгию, антифосфолипидный синдром, вторичную гемофилию, рецидивирующий полихондрит, саркоидоз, синдром ригидного человека и ревматическую лихорадку; дополнительный пример представляет собой эозинофильный фасцит; артриты, такие как анкилозирующий спондилит, ювенильный хронический артрит, заболевание Стилла взрослых, и SAPHO синдром; дополнительные примеры представляют собой сакроилеит, реактивный артрит, болезнь Стилла и подагру; гематологические нарушения, такие как апластическая анемия, первичная гемолитическая анемия (включая синдром холодовой агглютинации), гемолитическая анемия, вторичная по отношению к CLL(ХЛЛ) или системной красной волчанке; POEMS синдром, пернициозная анемия и гиперглобулинемическая пурпура Валденстрема; дополнительные примеры представляют собой агранулоцитоз, аутоиммунную нейтропению, болезнь Франклина, болезнь Селигмана, болезнь мю-цепей, паранеопластический синдром, вторич-

ный по отношению к тимоме и лимфоме, и образование ингибитора фактора VIII; эндокринопатии, такие как полиэндокринопатия и болезнь Аддисона; дополнительные примеры представляют собой аутоиммунную гипогликемию, аутоиммунный гипотиреоз, аутоиммунный инсулиновый синдром, тиреоидит де Карвена и опосредованную антителами толерантность к инсулину инсулиновых рецепторов; гепатогастроинтестинальные синдромы, такие как целиакия, болезнь Вилла, первичный билиарный цирроз, хронический активный гепатит, и первичносклерозирующий холангит; дополнительный пример представляет собой аутоиммунный гастрит; нефропатии, такие как быстро прогрессирующий гломерулонефрит, постстрептококковый нефрит, синдром Гудспатчера, мембранозный гломерулонефрит и криоглобулинемический нефрит; дополнительный пример представляет собой заболевание с минимальными изменениями; неврологические нарушения, такие как аутоиммунные нейропатии, множественный мононеврит, миастенический синдром Итона-Ламберта, хорея Сиденгама, сухотка спинного мозга и синдром Жиляна-Бара; дополнительные примеры представляют собой миелопатию/местную спастическую парестезию, миастению гравис, острую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию и хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию; сердечные и легочные заболевания, такие как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), фиброзирующий альвеолит, облитерирующий бронхолит, аллергический аспергиллез, муковисцидоз, синдром Лоффлера, миокардит и перикардит; дополнительные примеры представляют собой гиперчувствительный пневмонит и паранеопластический синдром, вторичный к раку легких; аллергические нарушения, такие как бронхиальная астма и синдром гипер-IgE; дополнительный, пример представляет собой преходящую слепоту; офтальмологические заболевания, такие как идиопатический хореоретинит; инфекционные болезни, такие как инфекция паравирусом В (включая синдром кистей-и-ступней); и акушерско-гинекологические заболевания, такие как рецидивирующие выкидыши, рецидивирующие рождения мертвого плода и задержка внутриутробного развития; дополнительный пример представляет собой паранеопластический синдром, вторичный по отношению к новообразованиям женских половых органов; репродуктивные нарушения у мужчин, такие как паранеопластический синдром, вторичный по отношению к новообразованиям яичек; и посттрансплантационные расстройства, такие как отторжение алло- или ксенотрансплантата и болезнь "трансплантат против хозяина".

В одном варианте осуществления заболевание с вовлечением клеток, экспрессирующих CD20, представляет собой воспалительное, иммунное и/или аутоиммунное нарушение, выбранное из язвенного колита, болезни Крона, ювенильного диабета, рассеянного склероза, иммуноопосредованных тромбоцитопений, таких как тромбоцитопеническая пурпура и хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитическая анемия (включая аутоиммунную гемолитическую анемию), миастения гравис, склеродермия и обыкновенная пузырчатка.

Настоящее изобретение не ограничено отдельными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Более того, различные модификации изобретения, в добавление к описанным в данном документе, будут ясны для специалиста в области техники из предшествующего описания. Указанные модификации полностью находятся в рамках формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устойчивая к механическому и температурному воздействию композиция анти-CD20 антител, содержащая терапевтически эффективное количество анти-CD20 антител, где композиция дополнительно содержит от 10 до 100 мМ ацетата натрия, от 25 до 100 мМ хлорида натрия, от 0,5 до 5% свободного основания аргинина, от 0,02 до 0,2 мМ EDTA, от 0,01 до 0,2% полисорбата 80 и рН которой скорректирован до значения от 5,0 до 7,0.

2. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором анти-CD20 антитело выбрано из группы, состоящей из фрагмента моноклонального антитела анти-CD20 и полноцепочечного антитела анти-CD20.

3. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором анти-CD20 антитело представляет собой моноклональное антитело.

4. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором композиция стабильна при температуре приблизительно 5°C в течение по меньшей мере 2 лет.

5. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором композиция стабильна при температуре приблизительно 25°C в течение по меньшей мере 3 месяцев.

6. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором композиция стабильна при температуре приблизительно 40°C в течение по меньшей мере 1 месяца.

7. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором композиция стабильна при температуре приблизительно 55°C в течение по меньшей мере 1 дня.

8. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором композиция стабильна при температуре приблизительно от 5 до 55°C в течение по меньшей мере 1 дня при встряхивании.

9. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором антитела анти-CD20 представлены в количестве приблизительно 20-300 мг/мл.

10. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором ацетат натрия представлен в количестве при-

близительно 50 мМ.

11. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором рН композиции антител анти-CD20 составляет приблизительно 5,5.

12. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором хлорид натрия представлен в количестве приблизительно 51 мМ.

13. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором свободное основание аргинина представлено в количестве приблизительно 1%.

14. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором EDTA представлена в количестве приблизительно 0,05 мМ.

15. Композиция анти-CD20 антител по п.1, в котором полисорбат 80 представлен в количестве приблизительно 0,02%.

16. Устойчивая к механическому и температурному воздействию композиция анти-CD20 антител, содержащая анти-CD20 антитела в концентрации 20-300 мг/мл, где композиция дополнительно содержит 50 мМ ацетата натрия, 51 мМ хлорида натрия, 1% свободного основания аргинина, 0,05 мМ EDTA, 0,02% полисорбата 80 и рН которой скорректирован до 5,5.

17. Устойчивая к механическому и температурному воздействию композиция антитела офатумумаба, содержащая офатумумаб в концентрации 20-300 мг/мл, где композиция дополнительно содержит 50 мМ ацетата натрия, 51 мМ хлорида натрия, 1% свободного основания аргинина, 0,05 мМ EDTA, 0,02% полисорбата 80 и рН которой скорректирован до 5,5.

18. Способ лечения заболевания, в котором задействованы клетки, экспрессирующие CD20 у млекопитающих, включающий введение композиции анти-CD20 антител, содержащей терапевтически эффективное количество антител, в котором композиция дополнительно содержит от 10 до 100 мМ ацетата натрия, от 25 до 100 мМ хлорида натрия, от 0,5 до 5% свободного основания аргинина, от 0,02 до 0,2 мМ EDTA, от 0,01 до 0,2% полисорбата 80 и рН которой скорректирован до значения от 5,0 до 7,0.

19. Способ лечения заболевания, в котором задействованы клетки, экспрессирующие CD20 у млекопитающих, включающий введение композиции антитела офатумумаба в 20-300 мг/мл, в котором композиция дополнительно содержит 50 мМ ацетата натрия, 51 мМ хлорида натрия, 1% свободного основания аргинина, 0,05 мМ EDTA, 0,02% полисорбата 80 и рН которой скорректирован до 5,5.

20. Способ по п.18 или 19, в котором композицию вводят млекопитающему внутривенным или подкожным путем.

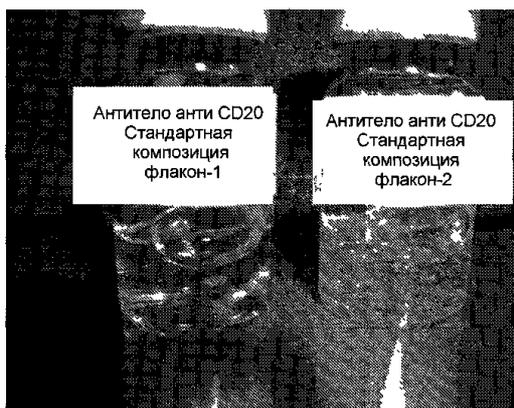
21. Способ по п.18 или 19, где заболевание, в котором задействованы клетки, экспрессирующие CD20, выбраны из группы, состоящей из онкогенных и иммунных заболеваний.

22. Способ по п.21, в котором онкогенные заболевания представляют собой В-клеточные лимфомы, выбранные из группы, состоящей из лимфобластного лейкоза/лимфомы из предшественников В-клеток и опухоли из зрелых В-клеток, такие как В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (SLL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазматическая лимфома, лимфома из клеток мантийной зоны (MCL), фолликулярная лимфома (FL), включая низкодифференцированную, среднедифференцированную и высокодифференцированную FL, кожную лимфому из клеток фолликулярного центра, В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны (MALT тип, узловой или селезеночный тип), волосатоклеточный лейкоз, диффузная В-крупноклеточная лимфома, лимфома Беркитта, плазмочитома, миеломная болезнь, посттрансплантационный лимфопролиферативный синдром, макроглобулинемию Вальденстрема, анапластическую крупноклеточную лимфому (ALCL).

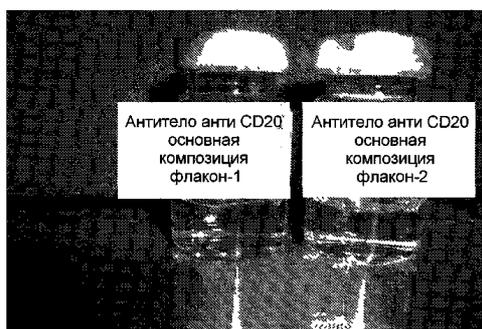
23. Способ по п.21, в котором иммунное заболевание выбрано из группы, состоящей из псориаза, псориатического артрита, дерматита, системной склеродермии и склероза, воспалительных заболеваний кишечника (IBD), болезни Крона, язвенного колита, респираторного дистресс-синдрома, менингита, энцефалита, увеита, гломерулонефрита, экземы, астмы, атеросклероза, нарушения адгезии лейкоцитов, рассеянного склероза, синдрома Рейно, синдрома Шегрена, ювенильного диабета, синдрома Рейтера, синдрома Бехчета, иммунокомплексного нефрита, IgA нефропатии, IgM полинейропатии, иммуноопосредованной тромбоцитопении, такой как острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура и хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, гемолитической анемии, миастении Гравис, волчаночного нефрита, системной красной волчанки, ревматоидного артрита (РА), атопического дерматита, пузырчатки, болезни Грейвса, тиреоидита Хашимото, грануломатоза Вегенера, синдрома Оменна, хронической почечной недостаточности, острого инфекционного мононуклеоза, ВИЧ и заболеваний, связанных с вирусом герпеса.

24. Композиция анти-CD20 антител по п.1 или 16, в которой антитело анти-CD20 выбрано из группы, состоящей из ритуксимаба, тозитумамаба, окрелизумаба, 7D8, 11B8, C6, IMMU-106, АМЕ-133 и TRU-015.

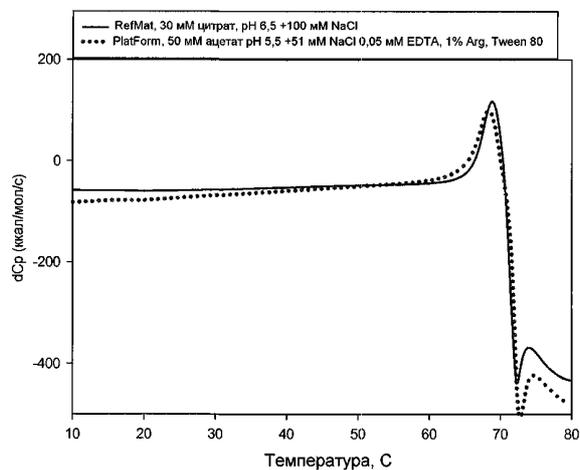
25. Способ по п.18 или 19, где заболевание, в котором задействованы клетки, экспрессирующие CD20, представляет собой ХОБЛ.



Фиг. 1

Фиг. 2
Скан ДСК (DSC)

Конформационный переход связанный с агрегацией Наблюдаемая T_m s
 T_m , основная = 68,4°C
 T_m , стандартная = 68,8°C
 $\Delta T_m > 0,5^\circ\text{C}$ считается значимой



Фиг. 3

