

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 912**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2004 E 04773700 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 1698640**

54 Título: **Procedimiento de estabilización de un anticuerpo, y preparación de anticuerpo de tipo disolución estabilizada**

30 Prioridad:

01.10.2003 JP 2003343645

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

09.03.2016

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, OHTEMACHI, CHIYODA-KU
TOKYO, JP**

72 Inventor/es:

**UENO, YUJI,;
KAYASHITA, TAKASHI;
ISHIHARA, ATSUSHI;
NAKAKURA, MASASHI y
YAMAUCHI, KYOKO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 562 912 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

Procedimiento de estabilización de un anticuerpo, y preparación de anticuerpo de tipo disolución estabilizada.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para estabilizar un anticuerpo en una disolución, y a una preparación de anticuerpo de tipo disolución estabilizada según se reivindica.

10 Técnica anterior

En años recientes, el tratamiento de una enfermedad usando un anticuerpo se ha adoptado rápidamente a través del avance de la biotecnología. También en Japón, en el campo médico se proporcionan diversas preparaciones de anticuerpo tales como Synagis, Remicade, Rituxan y Herceptin.

15 Cuando un anticuerpo se almacena en una disolución durante un tiempo prolongado, se produce la formación de un producto químicamente degradado, la formación de un agregado insoluble, la formación de una asociación soluble, o similar. Por lo tanto, a fin de proporcionar un fármaco de anticuerpo estable y seguro, ha habido una demanda de un procedimiento para suprimir la formación de tales sustancias.

20 Cuando un anticuerpo se almacena en un estado de una disolución durante un tiempo prolongado, se produce una reacción de degradación química tal como la escisión de un enlace de disulfuro o un enlace peptídico de un anticuerpo. Como resultado, existe preocupación por la disminución en su actividad, un efecto secundario inesperado o similar debido al deterioro en la calidad del mismo.

25 La proteína se insolubiliza mediante la agregación de moléculas cuya estructura de orden superior se destruye, con estructura de orden superior destruida debido a la agitación, esfuerzo térmico, o similar. Cuando tal agregado insoluble se administra intravenosamente, es factible que ocurra un efecto secundario grave tal como el choque anafiláctico (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 502938/98).

30 Como procedimiento para suprimir la formación de un agregado insoluble, se conoce un procedimiento de añadir ácido cítrico a 100 mmoles/l o más o heparina a 0,5% a una disolución de anticuerpo a fin de suprimir la formación de un agregado insoluble causado por esfuerzo térmico en una disolución acuosa de un factor de crecimiento de queratinocitos humano recombinante (Journal of Pharmaceutical Science, Vol. 83, nº 12, 1657-1661 (1994)).
 35 Además, el documento EP1254666 describe una preparación farmacéutica estabilizada de un anticuerpo contra un péptido relacionado con la hormona paratiroidea, en la que el anticuerpo se disuelve en una disolución tampón que contiene al menos un tampón seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, y sus sales, y está en forma de una disolución de pH 5 a 8. Además, como procedimiento para suprimir la formación de un agregado insoluble causado por esfuerzo térmico en una disolución acuosa de un anticuerpo, se conoce un
 40 procedimiento que usa un tampón de glicina o un tampón de histidina (documento WO 02/13860), un procedimiento de adición de polivinilpirrolidona a 2% o más (Pharmaceutical Research Vol. 11, nº 5, 624-632, 1994), un procedimiento de añadir un tampón de fosfato, cloruro de sodio y maltosa (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 504499/91), y similar.

45 Aunque algunas proteínas pueden no conducir a la insolubilización, se sabe que forman una asociación soluble que comprende un número pequeño de moléculas proteicas tal como un dímero o un trímero. Por ejemplo, cuando la proteína es un anticuerpo, se considera que se forma fácilmente un dímero soluble (Biochemistry, Vol. 38, 13960-13967 (1999)). Además, cuando se administra un dímero de un anticuerpo al cuerpo humano, existe el riesgo de provocar un efecto secundario tal como fiebre, náusea o hipotensión (solicitud de patente japonesa publicada sin
 50 examinar nº 502938/98).

Como procedimiento para suprimir la formación de una asociación soluble, se conoce un procedimiento de añadir un derivado de ácido nicotínico o un α -aminoácido que tiene una cadena lateral lipófila como agente estabilizante a una
 55 preparación líquida de inmunoglobulina (solicitud de patente japonesa publicada sin examinar nº 502938/98).

Como se describe anteriormente, ha habido una demanda de un procedimiento para proporcionar una preparación de anticuerpo estable que logre la estabilización del anticuerpo en una disolución al superar factores plurales de inestabilidad tales como la formación de un producto químicamente degradado, la formación de un agregado insoluble y la formación de una asociación soluble. Sin embargo, hasta ahora no se ha conocido tal procedimiento.
 60

Descripción

Un objetivo de la presente descripción es proporcionar un procedimiento para suprimir la formación de una asociación soluble de un anticuerpo en disolución; un procedimiento para suprimir la formación de un producto químicamente degradado de un anticuerpo en una disolución; y un procedimiento para estabilizar un anticuerpo en una disolución. Además, otro objetivo de la presente descripción es proporcionar una preparación de anticuerpo de
 65

5 tipo disolución en la que se suprime la formación de una asociación soluble; una preparación de anticuerpo de tipo disolución en la que se suprime la formación de un producto químicamente degradado; una preparación de anticuerpo de tipo disolución en la que se supriman la formación de una asociación soluble, la formación de un producto químicamente degradado y la formación de un agregado insoluble; un agente para suprimir la formación de una asociación soluble de un anticuerpo; un agente para suprimir la formación de un producto químicamente degradado de un anticuerpo; y un agente estabilizante para un anticuerpo.

La presente invención se refiere a los siguientes [1] a [16].

- 10 [1] Un procedimiento para estabilizar un anticuerpo en una disolución, que comprende añadir 10 a 30 mg/ml de glicina y 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico a la disolución de anticuerpo, en el que la concentración del anticuerpo es 0,01 a 150 mg/ml.
- 15 [2] El procedimiento según [1], en el que el procedimiento para estabilizar un anticuerpo es la supresión de la formación de un dímero y un producto químicamente degradado del anticuerpo en una disolución.
- 20 [3] Un procedimiento para suprimir la formación de un dímero de un anticuerpo en una disolución, que comprende añadir 10 a 30 mg/ml de glicina y 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico a la disolución de anticuerpo, en el que la concentración del anticuerpo es 0,01 a 150 mg/ml.
- [4] Un procedimiento para suprimir la formación de un producto químicamente degradado de un anticuerpo en una disolución, que comprende añadir 10 a 30 mg/ml de glicina y 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico a la disolución de anticuerpo, en el que la concentración del anticuerpo es 0,01 a 150 mg/ml.
- 25 [5] El procedimiento según uno cualquiera de [1] a [4], que comprende además un tensioactivo no iónico.
- [6] El procedimiento según uno cualquiera de [1] a [5], en el que el pH de la disolución está en el intervalo de 4 a 7.
- 30 [7] El procedimiento según uno cualquiera de [1] a [6], en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- [8] El procedimiento según uno cualquiera de [1] a [7], en el que el anticuerpo es uno cualquiera de los anticuerpos contra gangliósido GD3 y anticuerpos contra el receptor 4 de quimiocina CC (en lo sucesivo denominado como CCR4).
- 35 [9] Una preparación de anticuerpo en la que se suprime la formación de un dímero, de un producto químicamente degradado y de un agregado insoluble del anticuerpo, que comprende 10 a 30 mg/ml de glicina, 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico y 0,01 a 150 mg/ml de anticuerpo.
- 40 [10] La preparación según [9], que comprende además un tensioactivo no iónico.
- [11] La preparación según uno cualquiera de [9] a [10], en la que el pH de la disolución está en el intervalo de 4 a 7.
- 45 [12] La preparación según uno cualquiera de [9] a [11], en la que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- [13] La preparación según uno cualquiera de [9] a [12], en la que el anticuerpo es uno cualquiera de anticuerpos contra gangliósido GD3 y anticuerpos contra CCR4.
- 50 [14] Una disolución de anticuerpo, que comprende 10 a 30 mg/ml de glicina y 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico, y 0,01 a 150 mg/ml de anticuerpo como principio activo.
- 55 [15] Utilización de una disolución de anticuerpo en un procedimiento para estabilizar el anticuerpo, comprendiendo la disolución 10 a 30 mg/ml de glicina y 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico, y 0,01 a 150 mg/ml de anticuerpo como principio activo.
- 60 [16] Utilización según [15], en la que la estabilización del anticuerpo es la supresión de la formación de un dímero, de un producto químicamente degradado y de un agregado insoluble del anticuerpo en una disolución.

También se describen en la presente memoria:

- 65 (1) Un procedimiento para estabilizar un anticuerpo en disolución, que comprende añadir glicina y ácido cítrico al anticuerpo en una disolución.

- 5
- (2) El procedimiento según el (1) anterior, en el que el procedimiento para estabilizar un anticuerpo es la supresión de la formación de una asociación insoluble y de un producto químicamente degradado del anticuerpo en una disolución.
- (3) Un procedimiento para suprimir la formación de una asociación soluble de un anticuerpo en una disolución, que comprende añadir glicina al anticuerpo en una disolución.
- 10
- (4) Un procedimiento para suprimir la formación de un producto químicamente degradado de un anticuerpo en una disolución, que comprende añadir ácido cítrico al anticuerpo en una disolución.
- (5) El procedimiento según uno cualquiera de los (1) a (4) anteriores, en el que la concentración del anticuerpo es 0,01 a 150 mg/ml.
- 15
- (6) El procedimiento según uno cualquiera de los (1) a (3) anteriores, en el que la concentración de la glicina es 10 a 30 mg/ml.
- (7) El procedimiento según uno cualquiera de los (1), (2) y (4) anteriores, en el que la concentración del ácido cítrico es 0,1 a 50 mmoles/l.
- 20
- (8) El procedimiento según uno cualquiera de los (1) a (7) anteriores, que comprende además un tensioactivo no iónico.
- (9) El procedimiento según uno cualquiera de los (1) a (8) anteriores, en el que el pH de la disolución está en el intervalo de 4 a 7.
- 25
- (10) El procedimiento según uno cualquiera de los (1) a (9) anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 30
- (11) El procedimiento según uno cualquiera de los (1) a (10) anteriores, en el que el anticuerpo es uno cualquiera de anticuerpos contra gangliósido GD3 y anticuerpos contra el receptor 4 de quimiocina CC (denominado en lo sucesivo como CCR4).
- 35
- (12) Una preparación de anticuerpo de tipo disolución en la que se suprime la formación de una asociación soluble del anticuerpo, que comprende glicina y el anticuerpo.
- (13) Una preparación de anticuerpo de tipo disolución en la que se suprime la formación de un producto químicamente degradado del anticuerpo, que comprende ácido cítrico y el anticuerpo.
- 40
- (14) Una preparación de anticuerpo de tipo disolución en la que se suprime la formación de una asociación soluble, de un producto químicamente degradado y de un agregado insoluble del anticuerpo, que comprende glicina, ácido cítrico y el anticuerpo.
- 45
- (15) La preparación según uno cualquiera de los (12) a (14) anteriores, en la que la concentración del anticuerpo es 0,01 a 150 mg/ml.
- (16) La preparación según uno cualquiera de los (12), (14) y (15) anteriores, en la que la concentración de la glicina es 10 a 30 mg/ml.
- 50
- (17) La preparación según uno cualquiera de los (13) a (15) anteriores, en la que la concentración del ácido cítrico es 0,1 a 50 mmoles/l.
- (18) La preparación según uno cualquiera de los (12) a (17) anteriores, que comprende además un tensioactivo no iónico.
- 55
- (19) La preparación según uno cualquiera de los (12) a (18) anteriores, en la que el pH de la disolución está en el intervalo de 4 a 7.
- (20) La preparación según uno cualquiera de los (12) a (19) anteriores, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 60
- (21) La preparación según uno cualquiera de los (12) a (20) anteriores, en la que el anticuerpo es uno cualquiera de los anticuerpos contra gangliósido GD3 y anticuerpos contra CCR4.
- 65
- (22) Un agente para suprimir la formación de una asociación soluble de un anticuerpo en una disolución, que comprende glicina como principio activo.

(23) Un agente para suprimir la formación de un producto químicamente degradado de un anticuerpo en una disolución, que comprende ácido cítrico como componente eficaz.

5 (24) Un agente estabilizante para un anticuerpo, que comprende glicina y ácido cítrico como principio activo.

(25) El agente estabilizante para un anticuerpo según el (24) anterior, en el que la estabilización del anticuerpo es la supresión de la formación de una asociación soluble, de un producto químicamente degradado y de un agregado insoluble del anticuerpo en una disolución.

10 El anticuerpo a usar en la presente invención también incluye un fragmento de anticuerpo. Tal anticuerpo y fragmento de anticuerpo incluyen un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal; sin embargo, se prefiere un anticuerpo monoclonal.

15 Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo mencionado anteriormente incluye un anticuerpo de animal no humano, un anticuerpo recombinante, un fragmento de anticuerpo del mismo, y similar.

Los ejemplos del anticuerpo recombinante incluyen un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, y similar, y los ejemplos del anticuerpo humanizado incluyen un anticuerpo quimérico humano, un anticuerpo con CDR injertadas humano, y similares.

20 El anticuerpo quimérico humano se refiere a un anticuerpo que comprende VH y VL de un anticuerpo de animal no humano, y CH y CL de un anticuerpo humano. Como la CH de un anticuerpo quimérico humano, se puede usar cualquier CH en tanto que pertenezca a inmunoglobulina humana (en lo sucesivo denominada hlg); sin embargo, se prefieren aquellas que pertenecen a la clase de hlgG, y se puede usar una cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase hlgG, tal como hlgG1, hlgG2, hlgG3 y hlgG4. Además, como la CL de un anticuerpo quimérico humano, se puede usar cualquier CL en tanto que pertenezca a la hlg, y se pueden usar aquellas que pertenezcan a una clase κ o a una clase λ .

30 Además, los ejemplos del animal no humano incluyen un ratón, una rata, un hámster, un conejo, y similar.

El anticuerpo con CDR injertadas humano se refiere a un anticuerpo en el que las CDRs de VH y VL de un anticuerpo de animal no humano se injertan en una posición apropiada en VH y VL de un anticuerpo humano.

35 El anticuerpo con CDR injertadas humano de la presente invención se puede producir diseñando y construyendo los ADNc que codifican regiones V en las que las CDRs de VH y VL de un anticuerpo de animal no humano se ligan a los armazones estructurales (en lo sucesivo denominados FR(s)) de VH y VL de un anticuerpo humano opcional, insertándolos en un vector de expresión para una célula de animal que tiene los ADNc que codifican CH y CL de un anticuerpo humano, respectivamente, para construir de ese modo un vector de expresión de anticuerpo con CDR injertadas humano, e introduciendo entonces el vector de expresión en una célula de animal para expresar el anticuerpo con CDR injertadas humano.

40 Como la CH de un anticuerpo con CDR injertadas humano, se puede usar cualquier CH en tanto que pertenezca a la hlg; sin embargo, se prefieren aquellas que pertenecen a la clase hlgG, y se puede usar una cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase hlgG, tal como hlgG1, hlgG2, hlgG3 y hlgG4. Además, como la CL de un anticuerpo con CDR injertadas humano, se puede usar cualquier CL en tanto que pertenezca a la hlg, y se pueden usar aquellas que pertenezcan a una clase κ o a una clase λ .

45 El anticuerpo humano es originalmente un anticuerpo que existe de forma natural en el cuerpo humano; sin embargo, también incluye anticuerpos obtenidos de una biblioteca de fagos de anticuerpos humanos y de un animal transgénico productor de anticuerpos humanos, que se preparan en base al progreso reciente en técnicas de ingeniería genética, de ingeniería celular y de ingeniería del desarrollo. El anticuerpo que existe en el cuerpo humano se puede obtener, por ejemplo, aislando linfocito de sangre periférica humana, inmortalizándolo infectándolo con el virus de EB o similar, seguido de la clonación, obteniendo de ese modo un linfocito productor del anticuerpo, y cultivando entonces el linfocito y purificando el anticuerpo a partir del sobrenadante del cultivo. La biblioteca de fagos de anticuerpos humanos es una biblioteca en la que un fragmento de anticuerpo tal como Fab o scFv se expresa sobre la superficie de un fago insertando en el gen del fago un gen del anticuerpo preparado a partir de una célula B humana. Un fago que expresa un fragmento de anticuerpo que tiene una actividad de unión a antígeno deseada sobre su superficie se puede recuperar de la biblioteca usando como índice la actividad de unión a un sustrato que tiene sobre él un antígeno inmovilizado. El fragmento de anticuerpo se puede convertir posteriormente en una molécula de anticuerpo humano que comprende dos cadenas H de longitud completa y dos cadenas L de longitud completa mediante técnicas de ingeniería genética. El animal transgénico productor del anticuerpo humano es un animal no humano en el que se ha introducido en su célula un gen del anticuerpo humano. Específicamente, un ratón transgénico productor de anticuerpo humano se puede producir, por ejemplo, introduciendo un gen del anticuerpo humano en una célula ES de ratón, transplantando la célula ES en un embrión de etapa temprana de un ratón, y desarrollándolo entonces. Como procedimiento para preparar un anticuerpo humano a partir de tal animal

transgénico productor del anticuerpo humano, el anticuerpo humano se puede producir y acumular en un sobrenadante de cultivo cultivando un hibridoma productor de anticuerpo humano obtenido mediante un procedimiento para preparar hibridoma, generalmente llevado a cabo en un animal no humano.

- 5 Los ejemplos del fragmento de anticuerpo que se deben utilizar en la presente invención incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, diacuerpo, dsFv, un péptido que contiene CDR, y similar.

10 El Fab es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de alrededor de 50.000 y que tiene actividad de unión a antígeno, en el que aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L de longitud completa, entre los fragmentos obtenidos tratando una molécula de anticuerpo de tipo IgG con una proteasa, papaína (que escinde en el resto de aminoácido en la posición 224 de la cadena H), están unidos juntos a través de un enlace de disulfuro.

15 El Fab que se debe utilizar en la presente invención se puede obtener tratando un anticuerpo con una proteasa, papaína. Como alternativa, el Fab se puede producir insertando ADN que codifica Fab del anticuerpo en un vector de expresión para procarionota o un vector de expresión para eucariota, e introduciendo el vector en un procarionota o en un eucariota para expresar el Fab.

20 El F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de alrededor de 100.000 y que tiene actividad de unión a antígeno, que es significativamente más grande que el Fab unido vía un enlace de disulfuro de la región bisagra, entre fragmentos obtenidos tratando una molécula de anticuerpo de tipo IgG con una proteasa, pepsina (que escinde en el resto de aminoácido en la posición 234 de la cadena H).

25 El F(ab')₂ que se debe utilizar en la presente invención se puede obtener tratando un anticuerpo con una proteasa, pepsina. Como alternativa, el F(ab')₂ se puede preparar uniendo Fab' descrito más abajo vía un enlace de tioéter o un enlace de disulfuro.

30 El Fab' es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de alrededor de 50.000 y que tiene actividad de unión a antígeno, en el que se escinde el enlace de disulfuro de la región bisagra del F(ab')₂ anterior.

35 El Fab' que se debe utilizar en la presente invención se puede obtener tratando F(ab')₂ con un agente reductor, ditiotreitól. Como alternativa, el Fab' se puede producir insertando ADN que codifica un fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procarionota o un vector de expresión para eucariota, e introduciendo el vector en un procarionota o un eucariota para expresar el Fab'.

El scFv es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH en el que una cadena VH y una cadena VL están enlazadas usando un enlazador peptídico apropiado (en lo sucesivo denominado como P) y un fragmento de antígeno que tiene una actividad de unión a antígeno.

40 El scFv que se debe utilizar en la presente invención se puede producir obteniendo los ADNc que codifican VH y VL del anticuerpo, construyendo ADN que codifica el scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procarionota o un vector de expresión para eucariota, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procarionota o en un eucariota para expresar el scFv.

45 El diacuerpo es un fragmento de anticuerpo en el que scFv está dimerizado, y tiene una actividad de unión a antígeno divalente. El diacuerpo puede tener una actividad de unión a antígeno divalente al mismo antígeno o a antígenos diferentes. El diacuerpo a usar en la presente invención se puede producir obteniendo los ADNc que codifican VH y VL del anticuerpo, construyendo ADN que codifica scFv de manera que la longitud de la secuencia de aminoácidos de un enlazador no tenga más de 8 restos, insertando el ADN en un vector de expresión para procarionota o un vector de expresión para eucariota, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procarionota o un eucariota para expresar el diacuerpo.

50 El dsFv es un fragmento de anticuerpo en el que polipéptidos preparados sustituyendo un resto de aminoácido en cada una de VH y VL por un resto de cisteína están enlazados vía un enlace de disulfuro entre los restos de cisteína. El resto de aminoácido a sustituir por un resto de cisteína se puede seleccionar en base a una estimación de la estructura tridimensional del anticuerpo según el procedimiento mostrado por Reiter et al. (Protein Engineering, 7, 697-704 (1994)). El dsFv a usar en la presente invención se puede producir obteniendo los ADNc que codifican VH y VL del anticuerpo, construyendo ADN que codifica dsFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procarionota o un vector de expresión para eucariota, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procarionota o un eucariota para expresar el dsFv.

60 El péptido que contiene CDR comprende al menos una región de CDR de VH o VL. Un péptido que contiene CDRs plurales se puede enlazar directamente o vía un enlazador peptídico apropiado. El péptido que contiene CDR a usar en la presente invención se puede producir construyendo los ADN que codifican los CDRs de VH y VL del anticuerpo, insertando los ADN en un vector de expresión para procarionota o un vector de expresión para eucariota, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procarionota o un eucariota para expresar el péptido. Además, el

péptido que contiene CDR también se puede producir mediante un procedimiento sintético químico tal como un procedimiento de Fmoc (método de fluorenilmetoxicarbonilo) o un procedimiento de tBoc (método de t-butiloxicarbonilo).

5 El anticuerpo al que se puede aplicar la presente invención puede ser cualquier anticuerpo; sin embargo, los ejemplos específicos incluyen un anticuerpo monoclonal contra gangliósido GD3, un anticuerpo monoclonal contra CCR4, y similar. Los ejemplos del anticuerpo monoclonal contra gangliósido GD3 incluyen un anticuerpo monoclonal de ratón KM-641 (patente japonesa nº 3006943), un anticuerpo quimérico humano KM-871 (Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 304989/93), un anticuerpo con CDR injertadas humano KM-8871 (documento WO 01/23432), y similar. Los ejemplos del anticuerpo monoclonal contra CCR4 incluyen un anticuerpo quimérico humano KM2760 (documento WO 01/64754), un anticuerpo con CDR injertadas humano anti-CCR4 KM8760 (documento WO 03/18635), y similar.

15 En la presente invención, el producto químicamente degradado se refiere a una sustancia que resulta de la escisión de un enlace de disulfuro o de un enlace peptídico de un anticuerpo. Los ejemplos específicos incluyen aquellos en los que una parte o toda la cadena H o la cadena L del anticuerpo se ha perdido. Además, también se incluyen el fragmento Fab descrito anteriormente, aquellos en los que la cadena H y la cadena L del fragmento Fab se han escindido adicionalmente, y similares.

20 En la presente invención, el agregado insoluble se refiere a una sustancia insolubilizada que resulta de la agregación de moléculas cuya solubilidad en agua se ha reducido significativamente debido a que la hidrofobia de la superficie de las moléculas ha aumentado debido al cambio de la estructura de orden superior de las moléculas, o similar. En consecuencia, por la formación del agregado insoluble, se incrementa la turbidez de la preparación de anticuerpo de tipo disolución.

25 En la presente invención, la asociación soluble se refiere a una sustancia en la que moléculas de anticuerpo están asociadas entre sí, pero la estructura de orden superior de las moléculas de anticuerpo no ha cambiado o el cambio de la estructura de orden superior es relativamente menor, por lo que la solubilidad en agua del agregado se mantiene hasta un grado que no se deposita en una disolución acuosa. En consecuencia, el incremento en la turbidez de una preparación no aumenta por la formación de tal asociación soluble. En general, el número de moléculas de anticuerpo a asociar entre sí es relativamente pequeño, y habitualmente es un dímero, un trímero o un tetrámero.

35 Un procedimiento para producir la preparación de anticuerpo de tipo disolución de la presente invención no está particularmente limitado en tanto que sea un procedimiento que se lleva a cabo en la producción de una preparación general de anticuerpo de tipo disolución. Específicamente, se puede producir preparando previamente una disolución que contiene un anticuerpo y una disolución que contiene un aditivo, y mezclando las disoluciones. También se puede producir añadiendo directamente un anticuerpo o un material aditivo a un disolvente y disolviéndolo en él.

40 En el procedimiento de estabilización de un anticuerpo en una disolución, el procedimiento de la supresión de la formación de una asociación soluble en una disolución, y el procedimiento de la supresión de la formación de un producto químicamente degradado en una disolución de la presente invención, la concentración de anticuerpo puede ser cualquier valor en tanto que esté en el intervalo de 0,01 a 150 mg/ml; sin embargo, preferiblemente es 0,1 a 50 mg/ml, más preferiblemente 1 a 20 mg/ml.

45 En el procedimiento para estabilizar un anticuerpo en una disolución y el procedimiento para suprimir la formación de una asociación soluble en una disolución de la presente invención, la cantidad de glicina a añadir puede ser cualquier concentración en tanto que la concentración de glicina esté en el intervalo de 10 a 30 mg/ml, preferiblemente es 20 a 25 mg/ml, más preferiblemente 22 a 23 mg/ml. Los ejemplos de la forma de glicina a añadir incluyen glicina, sales farmacéuticamente aceptables de glicina, tales como hidrocloreto de glicina, y similares.

50 En el procedimiento para estabilizar un anticuerpo en una disolución, y el procedimiento para suprimir la formación de un producto químicamente degradado en una disolución de la presente invención, la cantidad de ácido cítrico a añadir puede ser cualquier concentración en tanto que la concentración de ácido cítrico esté en el intervalo de 0,1 a 50 mmoles/l, pero es preferiblemente 0,5 a 20 mmoles/l, más preferiblemente 1 a 10 mmoles/l. Los ejemplos de la forma de ácido cítrico a añadir incluyen ácido cítrico, sales farmacéuticamente aceptables de ácido cítrico tales como citrato de sodio, y similares.

55 El procedimiento para estabilizar un anticuerpo en una disolución de anticuerpo de la presente invención tiene un efecto sobre la supresión de la formación de un dímero, de un producto químicamente degradado y de un agregado insoluble del anticuerpo en una disolución.

60 La concentración de anticuerpo en la preparación de la presente invención puede ser cualquier concentración en tanto que esté en el intervalo de 0,01 a 150 mg/ml, pero es preferiblemente 0,1 a 50 mg/ml, más preferiblemente 1 a 20 mg/ml.

El contenido de glicina en la presente invención puede ser cualquier contenido en tanto que la concentración de glicina esté en el intervalo de 10 a 30 mg/ml, pero preferiblemente está en el intervalo de 20 a 25 mg/ml, más preferiblemente 22 a 23 mg/ml. Los ejemplos de la forma de glicina a añadir incluyen glicina, sales farmacéuticamente aceptables de glicina tales como hidrocloreuro de glicina, y similares.

El contenido de ácido cítrico en la presente invención puede ser cualquier contenido en tanto que la concentración de ácido cítrico está en el intervalo de 0,1 a 50 mmoles/l, pero preferiblemente está en el intervalo de 0,1 a 50 mmoles/l, más preferiblemente 1 a 10 mmoles/l. Los ejemplos de la forma de ácido cítrico a añadir incluyen ácido cítrico, sales farmacéuticamente aceptables de ácido cítrico tales como citrato de sodio, y similares.

La preparación de la presente invención puede comprender un tensioactivo no iónico además del anticuerpo, glicina y ácido cítrico mencionados anteriormente, y los ejemplos preferidos incluyen ésteres de ácidos grasos con sorbitán, ésteres de ácidos grasos con sorbitán polioxietilenados, polioxipropilenglicoles polioxietilenados, aceites de ricino hidrogenados polioxietilenados, ésteres de ácidos grasos con polietilenglicol, ésteres de ácidos grasos con glicerina, ésteres de ácidos grasos con sacarosa, y similares. Los ejemplos particularmente preferidos incluyen monolaurato de polioxietilensorbitán (polisorbato 20), monooleato de polioxietilensorbitán (polisorbato 80), y similares. La concentración de tensioactivo no iónico no está particularmente limitada en tanto que esté en una concentración farmacéuticamente aceptable, pero es preferiblemente 0,01 a 10 mg/ml, más preferiblemente 0,05 a 1 mg/ml, lo más preferible 0,1 a 0,3 mg/ml.

Se prefiere que el pH de la preparación de la presente invención se controle para que sea un valor apropiado. Como pH apropiado, preferiblemente es pH 4 a 7, más preferiblemente pH 5 a 6. En cuanto al pH, se puede usar cualquiera de los diversos reguladores del pH farmacéuticamente aceptables, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido acético, ácido láctico, ácido tartárico, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio.

Además, en la preparación de la presente invención, se pueden añadir aditivos farmacéuticamente aceptables como se ilustra más abajo.

Los ejemplos de un agente que ajusta la tonicidad incluyen sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, hidrogenofosfato de sodio y dihidrogenofosfato de sodio; azúcares y alcoholes de azúcares tales como glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, trehalosa, manitol, sorbitol y xilitol; glicerina, dextrano, propilenglicol, polietilenglicol, nicotinamida, y similares.

Los ejemplos de un agente analgésico incluyen inositol, clorobutanol, propilenglicol, alcohol bencílico, lidocaína, sulfato de magnesio, y similares.

Los ejemplos de un conservante incluyen parabenos, tal como p-hidroxibenzoato de metilo y p-hidroxibenzoato de etilo; ácido benzoico, etanol, edetato tetrasódico, ácido cítrico, ácido salicílico, sorbitol, ácido sórbico, glicerina, clorobutanol, fenol, propilenglicol, alcohol bencílico, y similar.

Los ejemplos de un agente que controla la viscosidad incluyen alginato de sodio, goma de xantana, glicerina, gelatina, dextrano, dextrina, éteres alquílicos de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa; polietilenglicol, polialcohol vinílico.

Los ejemplos de un antioxidante incluyen ácido eritóbico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, tioglicolato de sodio, α -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, pirosulfito de sodio, hidrocloreuro de cisteína, edetato sódico, y similares.

Un procedimiento de administración preferido para la preparación de la presente invención es la inyección; sin embargo, también se pueden emplear formas de administración percutánea, transmucosal, transnasal, pulmonar, oral u otras. Un procedimiento de administración particularmente preferido por medio de inyección es un procedimiento de inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular. Además, usando un dispositivo de administración apropiado, se puede administrar directamente a una región de lesión tal como una región tumoral o una región inflamatoria.

Además, la preparación de la presente invención se puede usar después de que se diluye con un diluyente en el momento del uso. Los ejemplos del diluyente incluyen infusiones tales como una disolución salina fisiológica y una disolución de azúcar. La preparación diluida se puede administrar al cuerpo mientras que la velocidad se controla mediante infusión intravenosa, o usando una bomba de jeringuilla o similar.

La preparación de anticuerpo de tipo disolución de la presente invención se puede usar como una inyección para esterilizar la preparación mediante una técnica estándar tal como filtración aséptica seguido de su envasado en un recipiente inyectable tal como una ampolla, un vial o una jeringuilla en un entorno aséptico. Además, cuando la preparación de anticuerpo de tipo disolución se envasa en un recipiente, se puede llevar a cabo también la

sustitución del gas en el espacio del recipiente usando un gas inerte tal como nitrógeno o argón.

En adelante, la presente invención se describirá específicamente haciendo referencia a los Ejemplos; sin embargo, la presente invención no está limitada a estos Ejemplos.

5

Mejor modo de poner en práctica la invención

Ejemplo 1 Preparación de la preparación de muestra

10 Se preparó cada una de las composiciones en disolución de las formulaciones 1 a 5 mostradas en la Tabla 1, se sometieron a filtración aséptica, se inyectaron en un vial de vidrio, y entonces se cerraron herméticamente con un tapón de caucho y una tapa de aluminio, con lo que se preparó una preparación de muestra. Todas estas operaciones se llevaron a cabo en un entorno aséptico. En cuanto al anticuerpo, se usó un anticuerpo quimérico humano contra gangliósido GD3 KM-871, que se produjo mediante el procedimiento descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 304989/93.

15

Tabla 1

	Concentración de anticuerpo (mg/ml)	Aditivo	pH
Formulación 1	2	Ácido fosfórico: 10 mmol/l	6
Formulación 2	2	Ácido cítrico: 10 mmol/l	6
Formulación 3	2	Ácido cítrico: 10 mmol/l Manitol: 50 mg/ml	6
Formulación 4	2	Ácido cítrico: 10 mmol/l Glicina: 23 mg/ml	6
Formulación 5	2	Ácido cítrico: 10 mmol/l Glicina: 23 mg/ml Polisorbato 80: 0,1 mg/ml	6

20 Ejemplo 2 Ensayo de estabilidad

Cada preparación de muestra preparada en el Ejemplo 1 se almacenó a 40°C durante 1 mes, y entonces se llevó a cabo un ensayo de estabilidad para los siguientes apartados del ensayo.

25 (1) Observación visual del contenido

El contenido de cada preparación de muestra se observó visualmente con luces fluorescentes blancas mientras se agitaba suavemente, y se determinó la presencia o ausencia de turbidez.

30 (2) Medida de la turbidez

El contenido de cada preparación de muestra se recogió en una microcelda de cuarzo, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 400 nm (O.D.400) con un espectrofotómetro de ultravioleta (Hitachi U-3300).

35 (3) HPLC de filtración en gel

Se llevó a cabo un análisis mediante HPLC en las siguientes condiciones para determinar el contenido de cada preparación de muestra.

40 (Condiciones de HPLC)

Columna: TSKgel G3000 SWXL (Tosoh Co.)

Fase móvil: 0,5 moles/l de tampón de fosfato que contiene 0,3 moles/l de cloruro de sodio

Longitud de onda de medida: 280 nm

45 Caudal: 1 ml/min.

Cantidad inyectada: 40 µl

Aparato: Sistema LC-10A (Shimadzu Corporation)

La suma de las áreas de los picos de los componentes eluidos en el lado de mayor peso molecular del pico de la molécula sin cambiar en el diagrama de HPLC se consideró como el área del pico de asociaciones solubles, y el contenido de las asociaciones solubles se calculó mediante la siguiente ecuación (1).

50

$$(1) \text{ (Contenido de asociaciones solubles (\%))} = (\text{Área del pico de asociaciones solubles}) / (\text{Área del pico total}) \times 100 \quad (1)$$

55 Además, la suma de las áreas de los picos de los componentes eluidos en el lado de peso molecular inferior del pico

de la molécula sin cambiar en el diagrama de HPLC se consideró como el área del pico de productos químicamente degradados, y el contenido de los productos químicamente degradados se calculó mediante la siguiente ecuación (2).

$$5 \quad (\text{Contenido de productos químicamente degradados (\%)} = (\text{Área del pico de los productos químicamente degradados}) / (\text{Área del pico total}) \times 100 \quad (2)$$

Los resultados de la (1) observación visual del contenido y de la (2) medida de la turbidez (O.D.400) se muestran en la Tabla 2. En la Tabla 2, los valores de la turbidez (O.D.400) indican la cantidad de incremento durante el período de almacenamiento (40°C, 1 mes), que se obtuvo restando el valor inicial del valor de medida.

Tabla 2

Almacenamiento a 40°C durante 1 mes		
	Presencia u ausencia de turbidez (observación visual)	Cantidad de incremento de O.D.400
Formulación 1	Ausencia	0,002
Formulación 2	Ausencia	0,000
Formulación 3	Ausencia	0,002
Formulación 4	Ausencia	0,002
Formulación 5	Ausencia	0,002

15 A partir de los resultados de la observación visual del contenido en todas las formulaciones (formulaciones 1 a 5), no se observó turbidez. Además, en todas las formulaciones, se observó raramente un incremento en la turbidez (O.D.400).

Los resultados de la HPLC de filtración en gel se muestran en la Tabla 3. El valor mostrado en la Tabla 3 indica la cantidad de incremento durante el período de almacenamiento (40°C, 1 mes), que se obtuvo restando el valor inicial del valor de medida.

Tabla 3

Cantidad de incremento tras el almacenamiento a 40°C durante 1 mes		
	Asociaciones solubles (%)	Productos químicamente degradados (%)
Formulación 1	0,20	1,48
Formulación 2	0,20	0,59
Formulación 3	0,22	0,47
Formulación 4	0,02	0,51
Formulación 5	0,04	0,42

25 Al comparar la formulación 1 (ácido fosfórico) con las formulaciones 2 y 3 (ácido cítrico), la cantidad de incremento de los productos químicamente degradados en las formulaciones 2 y 3 fue más pequeña que en la formulación 1. De los resultados anteriores, se encontró que añadiendo ácido cítrico a una disolución, se puede reducir el incremento en los productos químicamente degradados.

30 Además, al comparar la formulación 2 con la formulación 4, la cantidad de incremento de asociaciones solubles en la formulación 4 fue más pequeña que aquella en la formulación 2, y se encontró que, añadiendo glicina a una disolución, se puede reducir el incremento en las asociaciones solubles.

35 También, en la formulación 5 obtenida añadiendo además polisorbato 80 a la formulación 4, la estabilidad de la disolución se mantuvo.

Ejemplo 3 Confirmación del efecto sobre la supresión de agregados insolubles 1 (Preparación de muestra)

40 Se preparó cada una de las composiciones en disolución de las formulaciones 7 a 11 mostradas en la Tabla 4, se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poros de 0,2 µm, y entonces se inyectaron en un tubo de ensayo de vidrio. El tubo de ensayo se cerró herméticamente con un tapón de silicona, con lo que se preparó una preparación de muestra. En cuanto al anticuerpo, se usó un anticuerpo quimérico humano contra gangliósido GD3 KM-871, descrito en la Solicitud de Patente Japonesa Publicada Sin Examinar nº 304989/93.

45 Tabla 4

	Concentración de anticuerpo (mg/ml)	Aditivo	pH
Formulación 7	2	Ácido fosfórico: 50 mmol/l	6
Formulación 8	2	Ácido cítrico: 0,1 mmol/l Glicina: 10 mg/ml	6

	Concentración de anticuerpo (mg/ml)	Aditivo	pH
Formulación 9	2	Ácido cítrico: 0,1 mmol/l Glicina: 30 mg/ml	6
Formulación 10	2	Ácido cítrico: 50 mmol/l Glicina: 10 mg/ml	6
Formulación 11	2	Ácido cítrico: 50 mmol/l Glicina: 30 mg/ml	6

Ejemplo 4 Confirmación del efecto sobre la supresión de agregados insolubles 1 (Ensayo de estabilidad)

5 Cada preparación de muestra preparada en el Ejemplo 3 se almacenó a 70°C durante 270 segundos, y entonces se llevó a cabo un ensayo de estabilidad para los siguientes apartados de ensayo.

(1) Observación visual del contenido

10 El contenido de cada preparación de muestra se observó visualmente bajo luces fluorescentes blancas mientras se agitó suavemente, y se determinó la presencia o ausencia de turbidez.

(2) Medida de la turbidez

15 El contenido de cada preparación de muestra se recogió en una microcelda de cuarzo, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 400 nm (O.D.400) con un espectrofotómetro de ultravioleta (Hitachi U-3300).

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la (1) observación visual del contenido y de la (2) medida de la turbidez (O.D.400).

20 Tabla 5

Tras almacenar a 70°C durante 270 segundos		
	Presencia u ausencia de turbidez (observación visual)	O.D.400
Formulación 7	Turbidez blanca aparente	2,471
Formulación 8	Ausencia	0,009
Formulación 9	Ausencia	0,011
Formulación 10	Ausencia	0,020
Formulación 11	Ausencia	0,033

25 En la formulación 7, se observó turbidez blanca aparente como resultado de la observación visual, y la turbidez (O.D.400) también mostró un valor elevado. Por otro lado, en las formulaciones 8, 9, 10 y 11, no se observó turbidez como resultado de la observación visual del contenido, y se confirmó que los valores de la turbidez (O.D.400) son significativamente menores que aquellos de la formulación 7.

Ejemplo 5 Confirmación del efecto sobre la supresión de agregados insolubles 2 (Preparación de muestra)

30 Se preparó cada una de las composiciones en disolución de las formulaciones 12 a 16 mostradas en la Tabla 6, se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poros de 0,2 µm, y entonces se inyectaron en un tubo de ensayo de vidrio. El tubo de ensayo se cerró herméticamente con un tapón de silicona, con lo que se preparó una preparación de muestra. En cuanto al anticuerpo, se usó un anticuerpo con CDR injertadas humano contra CCR4 descrito en el documento WO 03/18635, KM8760.

35

Tabla 6

	Concentración de anticuerpo (mg/ml)	Aditivo	pH
Formulación 12	2	Ácido fosfórico: 50 mmol/l	6
Formulación 13	2	Ácido cítrico: 0,1 mmol/l Glicina: 10 mg/ml	6
Formulación 14	2	Ácido cítrico: 0,1 mmol/l Glicina: 30 mg/ml	6
Formulación 15	2	Ácido cítrico: 50 mmol/l Glicina: 10 mg/ml	6
Formulación 16	2	Ácido cítrico: 50 mmol/l Glicina: 30 mg/ml	6

Ejemplo 6 Confirmación del efecto sobre la supresión de agregados insolubles 2 (Ensayo de estabilidad)

Cada preparación de muestra preparada en el Ejemplo 5 se almacenó a 70°C durante 210 segundos, y entonces se llevó a cabo un ensayo de estabilidad para los siguientes apartados de ensayo.

(1) Observación visual del contenido

El contenido de cada preparación de muestra se observó visualmente bajo luces fluorescentes blancas mientras se agitó suavemente, y se determinó la presencia o ausencia de turbidez.

(2) Medida de la turbidez

El contenido de cada preparación de muestra se recogió en una microcelda de cuarzo, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 400 nm (O.D.400) con un espectrofotómetro de ultravioleta (Hitachi U-3300).

En la Tabla 7 se muestran los resultados de la (1) observación visual del contenido y de la (2) medida de la turbidez (O.D.400).

Tabla 7

Tras almacenar a 70°C durante 210 segundos		
	Presencia u ausencia de turbidez (observación visual)	O.D.400
Formulación 12	Turbidez blanca aparente	0,698
Formulación 13	Ausencia	0,079
Formulación 14	Ausencia	0,006
Formulación 15	Ausencia	0,056
Formulación 16	Ausencia	0,024

En la formulación 12, se observó turbidez blanca aparente como resultado de la observación visual, y la turbidez (O.D.400) también mostró un valor elevado. Por otro lado, en las formulaciones 13, 14, 15 y 16, no se observó turbidez como resultado de la observación visual del contenido, y se confirmó que los valores de la turbidez (O.D.400) son significativamente menores que aquellos de la formulación 12.

Ejemplo 7 Confirmación del efecto sobre la supresión de asociaciones solubles y de productos químicamente degradados (Preparación de muestra)

Se preparó cada una de las composiciones en disolución de las formulaciones 17 a 21 mostradas en la Tabla 8, se sometieron a filtración aséptica, se inyectaron en un vial de vidrio, y entonces se cerraron herméticamente con un tapón de caucho y una tapa de aluminio, con lo que se preparó una preparación de muestra. Todas estas operaciones se llevaron a cabo en un entorno aséptico. En cuanto al anticuerpo, se usó un anticuerpo con CDR injertadas humano contra CCR4 descrito en el documento WO 03/18635, KM8760.

Tabla 8

	Concentración de anticuerpo (mg/ml)	Aditivo	pH
Formulación 17	2	Ácido fosfórico: 50 mmol/l	6
Formulación 18	2	Ácido cítrico: 0,1 mmol/l Glicina: 10 mg/ml	6
Formulación 19	2	Ácido cítrico: 0,1 mmol/l Glicina: 30 mg/ml	6
Formulación 20	2	Ácido cítrico: 50 mmol/l Glicina: 10 mg/ml	6
Formulación 21	2	Ácido cítrico: 50 mmol/l Glicina: 30 mg/ml	6

Ejemplo 8 Confirmación del efecto sobre la supresión de asociaciones solubles y de productos químicamente degradados (Ensayo de estabilidad)

Cada preparación de muestra preparada en el Ejemplo 7 se almacenó a 40°C durante 1 mes, y entonces se evaluó la estabilidad analizando el contenido mediante HPLC de filtración en gel en las siguientes condiciones.

(Condiciones de HPLC)

Columna: TSKgel G3000 SWXL (Tosoh Co.)

Fase móvil: 0,05 moles/l de tampón de fosfato que contiene 0,3 moles/l de cloruro de sodio

Longitud de onda de medida: 280 nm
 Caudal: 1 ml/min.
 Cantidad inyectada: 40 µl
 Aparato: Sistema LC-10A (Shimadzu Corporation)

La suma de las áreas de los picos de los componentes eluidos en el lado de mayor peso molecular del pico de la molécula sin cambiar en el diagrama de HPLC se consideró como el área del pico de asociaciones solubles, y el contenido de las asociaciones solubles se calculó mediante la siguiente ecuación.

$$\text{(Contenido de asociaciones solubles (\%))} = \frac{\text{(Área del pico de asociaciones solubles)}}{\text{(Área del pico total)}} \times 100 \quad (1)$$

Además, la suma de las áreas de los picos de los componentes eluidos en el lado de peso molecular inferior del pico de la molécula sin cambiar en el diagrama de HPLC se consideró como el área del pico de productos químicamente degradados, y el contenido de los productos químicamente degradados se calculó mediante la siguiente ecuación.

$$\text{(Contenido de productos químicamente degradados (\%))} = \frac{\text{(Área del pico de los productos químicamente degradados)}}{\text{(Área del pico total)}} \times 100 \quad (2)$$

Los resultados de la HPLC de filtración en gel se muestran en la Tabla 9. Los resultados muestran la cantidad incrementada durante el período de almacenamiento (40°C, 1 mes), que se obtuvo restando el valor inicial del valor de medida.

Tabla 9

Cantidad de incremento tras el almacenamiento a 40°C durante 1 mes		
	Asociaciones solubles (%)	Productos químicamente degradados (%)
Formulación 17	0,11	0,96
Formulación 18	-0,02	0,44
Formulación 19	0,02	0,47
Formulación 20	-0,05	0,35
Formulación 21	0,05	0,38

Como resultado de comparar la formulación 17 con las formulaciones 18, 19, 20 y 21, se encontró que las formulaciones 18, 19, 20 y 21 tienen una excelente estabilidad en vista de tanto las asociaciones solubles como los productos químicamente degradados.

Ejemplo 9 Confirmación de la estabilidad de la preparación (Preparación de muestra)

Se preparó una composición en disolución de una formulación 22 mostrada en la Tabla 10, se sometió a filtración aséptica, se inyectó en un vial de vidrio, y entonces se cerró herméticamente con un tapón de caucho y una tapa de aluminio, con lo que se preparó una preparación de muestra. Todas estas operaciones se llevaron a cabo en un entorno aséptico. En cuanto al anticuerpo, se usó un anticuerpo con CDR injertadas humano contra CCR4 descrito en el documento WO 03/18635, KM8760.

Tabla 10

	Concentración de anticuerpo (mg/ml)	Aditivo	pH
Formulación 22	4	Ácido cítrico: 2 mmol/l Glicina: 22,5 mg/ml Polisorbato 80: 0,2 mg/ml	5,5

Ejemplo 10 Confirmación de la estabilidad de la preparación (Almacenamiento a 40°C)

La preparación de muestra preparada en el Ejemplo 9 se almacenó a 40°C durante 1 mes, y entonces se evaluó la estabilidad analizando el contenido mediante HPLC de filtración en gel en las siguientes condiciones.

(Condiciones de HPLC)

Columna: TSKgel G3000 SWxL (Tosoh Co.)
 Fase móvil: 0,05 moles/l de tampón de fosfato que contiene 0,3 moles/l de cloruro de sodio
 Longitud de onda de medida: 280 nm
 Caudal: 1 ml/min.
 Cantidad inyectada: 40 µl
 Aparato: Sistema LC-10A (Shimadzu Corporation)

La suma de las áreas de los picos de los componentes eluidos en el lado de mayor peso molecular del pico de la molécula sin cambiar en el diagrama de HPLC se consideró como el área del pico de asociaciones solubles, y el contenido de las asociaciones solubles se calculó mediante la siguiente ecuación (1).

$$(1) \text{ (Contenido de asociaciones solubles (\%))} = (\text{Área del pico de asociaciones solubles}) / (\text{Área del pico total}) \times 100 \quad (1)$$

Además, la suma de las áreas de los picos de los componentes eluidos en el lado de peso molecular inferior del pico de la molécula sin cambiar en el diagrama de HPLC se consideró como el área del pico de productos químicamente degradados, y el contenido de los productos químicamente degradados se calculó mediante la siguiente ecuación (2).

$$(2) \text{ (Contenido de productos químicamente degradados (\%))} = (\text{Área del pico de los productos químicamente degradados}) / (\text{Área del pico total}) \times 100 \quad (2)$$

Los resultados de la HPLC de filtración en gel se muestran en la Tabla 11. Los resultados muestran la cantidad incrementada durante el período de almacenamiento (40°C, 1 mes), que se obtuvo restando el valor inicial del valor de medida.

Tabla 11

Cantidad de incremento tras el almacenamiento a 40°C durante 1 mes		
	Asociaciones solubles (%)	Productos químicamente degradados (%)
Formulación 22	-0,02	0,46

Se confirmó que la formulación 22 que comprende ácido cítrico y glicina tiene una excelente estabilidad en vista tanto de las asociaciones solubles como de los productos químicamente degradados.

Ejemplo 11 Confirmación de la estabilidad de la preparación (Almacenamiento a 70°C)

El contenido de la preparación preparada en el Ejemplo 9 se filtró a través de un filtro con un tamaño de poros de 0,2 µm, y entonces se inyectó en un tubo de ensayo de vidrio. La abertura del tubo de ensayo se cerró herméticamente con un tapón, con lo que se preparó una muestra. La muestra se almacenó a 70°C durante 210 segundos, y entonces se llevó a cabo un ensayo de estabilidad para los siguientes apartados de ensayo.

(1) Observación visual del contenido

El contenido de cada preparación de muestra se observó visualmente bajo luces fluorescentes blancas mientras se agitó suavemente, y se determinó la presencia o ausencia de turbidez.

(2) Medida de la turbidez

El contenido de cada preparación de muestra se recogió en una microcelda de cuarzo, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 400 nm (O.D.400) con un espectrofotómetro de ultravioleta (Hitachi U-3300).

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la (1) observación visual del contenido y de la (2) medida de la turbidez (O.D.400).

Tabla 12

Tras almacenar a 70°C durante 210 segundos		
	Presencia o ausencia de turbidez (observación visual)	O.D.400
Formulación 22	Ausencia	0,014

Se confirmó que la formulación 22, que es una preparación que comprende ácido cítrico y glicina, tiene igualmente una excelente estabilidad en vista de los agregados insolubles.

Aplicabilidad industrial

Según la presente descripción, se puede proporcionar un procedimiento para estabilizar un anticuerpo en una disolución, y una preparación de anticuerpo de tipo disolución estabilizada.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para estabilizar un anticuerpo en una disolución, que comprende añadir 10 a 30 mg/ml de glicina y 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico a la disolución de anticuerpo, en el que la concentración del anticuerpo es 0,01 a 150 mg/ml.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento de estabilización de un anticuerpo es la supresión de la formación de un dímero y de un producto químicamente degradado del anticuerpo en una disolución.
- 10 3. Procedimiento para suprimir la formación de un dímero de un anticuerpo en una disolución, que comprende añadir 10 a 30 mg/ml de glicina y 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico a la disolución de anticuerpo, en el que la concentración del anticuerpo es 0,01 a 150 mg/ml.
- 15 4. Procedimiento para suprimir la formación de un producto químicamente degradado de un anticuerpo en una disolución, que comprende añadir 10 a 30 mg/ml de glicina y 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico a la disolución de anticuerpo, en el que la concentración del anticuerpo es 0,01 a 150 mg/ml.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un tensioactivo no iónico.
- 20 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el pH de la disolución se encuentra en el intervalo de 4 a 7.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 25 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo es cualquiera de los anticuerpos contra gangliósido GD3 y anticuerpos contra el receptor 4 de quimiocina CC (al que se hace referencia en adelante como CCR4).
- 30 9. Preparación de anticuerpo en la que se suprime la formación de un dímero, de un producto químicamente degradado y de un agregado insoluble del anticuerpo, que comprende 10 a 30 mg/ml de glicina, 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico y 0,01 a 150 mg/ml de anticuerpo.
- 35 10. Preparación según la reivindicación 9, que comprende además un tensioactivo no iónico.
11. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en la que el pH de la disolución se encuentra en el intervalo de 4 a 7.
- 40 12. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
13. Preparación según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que el anticuerpo es cualquiera de los anticuerpos contra gangliósido GD3 y anticuerpos contra CCR4.
- 45 14. Disolución de anticuerpo, que comprende 10 a 30 mg/ml de glicina y 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico, y 0,01 a 150 mg/ml de anticuerpo como un principio activo.
- 50 15. Utilización de una disolución de anticuerpo en un procedimiento para estabilizar el anticuerpo, comprendiendo la disolución 10 a 30 mg/ml de glicina y 0,1 a 50 mmoles/l de ácido cítrico, y 0,01 a 150 mg/ml de anticuerpo como un principio activo.
16. Utilización según la reivindicación 15, en la que la estabilización del anticuerpo es la supresión de la formación de un dímero, de un producto químicamente degradado y de un agregado insoluble del anticuerpo en una disolución.