

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 076**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/34 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2012 PCT/JP2012/053687**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12111762**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2012 E 12747045 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2676677**

54 Título: **Preparación farmacéutica de anticuerpo anti-CD40 muy concentrada**

30 Prioridad:

17.02.2011 JP 2011031894

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

04.12.2019

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, Ohtemachi Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**ENDO, RYOSUKE;
ISHIKAWA, TOMOYOSHI y
SUETOMO, HIROYUKI**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 734 076 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

Preparación farmacéutica de anticuerpo anti-CD40 muy concentrada.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una preparación de disolución acuosa como se reivindica que contiene un anticuerpo antagonista anti-CD40 de concentración elevada.

10 **Técnica anterior**

En años recientes, se han desarrollado muchos fármacos de anticuerpos terapéuticos, y se puede mencionar el anticuerpo anti-CD40 como uno de los anticuerpos. CD40 es un antígeno que se expresa en la superficie de células B, DC, macrófagos, células endoteliales, células epiteliales o sus células tumorales, y los anticuerpos anti-CD40 que actúan sobre CD40 se clasifican esencialmente en un agonista (asimismo denominado "anticuerpo agonista") y un antagonista (asimismo denominado "anticuerpo antagonista"). Es conocido que la activación de células B es una acción del anticuerpo agonista, y este anticuerpo se puede ejemplificar mediante un anticuerpo agonista anti-CD40 que se describe en la bibliografía 1 de patente.

Por otro lado, debido a que CD40 desempeña un papel importante en respuestas inmunitarias, se espera que se pueda lograr la inmunosupresión para el trasplante de órganos y agentes terapéuticos para enfermedades autoinmunes inhibiendo la unión de CD40 y su ligando usando el anticuerpo antagonista. En este caso, el anticuerpo antagonista anti-CD40 es necesario para inhibir la unión de CD40L a CD40 humano y asimismo, el propio anticuerpo es necesario para no activar CD40.

Hasta el momento, se han realizado muchos estudios sobre el anticuerpo anti-CD40, pero la mayoría de los anticuerpos anti-CD40 identificados son anticuerpos agonistas, y existen muy pocos anticuerpos antagonistas identificados, tales como 4D11 (bibliografía 1 de patente), 5D12 (bibliografía 2 de patente), o similares. Entre ellos, en la bibliografía 3 de patente se describe un anticuerpo 4D11 modificado (en la presente memoria en adelante, denominado como "4D11G4PE"), y este anticuerpo modificado evita la expresión de la actividad agonista tanto *in vitro* como *in vivo*, en comparación con el anticuerpo 4D11 original. Por esta razón, se espera que este anticuerpo modificado sea muy útil como el anticuerpo antagonista anti-CD40 en la supresión inmune para el trasplante de órganos o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (bibliografía 3 de patente).

Por cierto, el desarrollo de estos fármacos de anticuerpos terapéuticos requiere una tecnología de formulación especializada, así como una tecnología para modificar el propio anticuerpo. Es decir, las proteínas tales como anticuerpos o similares tienen un peso molecular elevado, una pluralidad de diferentes grupos funcionales, y una estructura tridimensional compleja, a diferencia de las moléculas sintéticas químicas convencionales. Por lo tanto, cuando se formulan anticuerpos terapéuticos, existe una demanda de una tecnología para almacenar los anticuerpos a la vez que se mantiene su estructura tridimensional y su actividad o características biológicas.

Una de estas preparaciones de anticuerpos es, por ejemplo, una preparación liofilizada como se describe en la bibliografía 4 de patente. Sin embargo, la preparación liofilizada requiere un procedimiento de preparación complejo para la administración que impone una responsabilidad al profesional en el campo médico, y asimismo surgen problemas respecto al riesgo de contaminación bacteriana debido a la manipulación. Por el contrario, una preparación de disolución requiere un procedimiento de preparación simple antes de la administración, y de este modo se reduce el riesgo de contaminación bacteriana. Por lo tanto, en el campo médico, la preparación de disolución es considerada más preferida que la preparación liofilizada.

La bibliografía 6 de patente sugiere una composición que comprende el anticuerpo, un agente amortiguador para pH 5-7, y arginina-HCl. La bibliografía 7 de patente proporciona una formulación que comprende un poliol, pero que no comprende NaCl, y un anticuerpo.

Para uso médico, el anticuerpo se administra generalmente vía una ruta intravenosa o subcutánea. De ellas, la administración subcutánea de preparaciones inyectables o similares se lleva a cabo algunas veces debido a la conveniencia de administración o similar. Puesto que la administración subcutánea depende del límite del volumen (típicamente 1.5 ml o menos) y de la dosis de administración requerida (típicamente 50 mg o más), a menudo es necesario administrar un anticuerpo de concentración elevada.

Por ejemplo, cuando se administran 2 mg/kg de anticuerpo a un paciente cada semana, y el peso corporal medio del paciente es 70 kg, la dosis de administración del anticuerpo es 140 mg, y la concentración del anticuerpo para la administración subcutánea debería ser aproximadamente 100 mg/ml (en este caso, aproximadamente 140 mg de anticuerpo están contenidos en 1.4 ml).

Sin embargo, la preparación de anticuerpo muy concentrada tiene varios problemas. Uno de los problemas es la aparición de turbidez o materia extraña insoluble atribuida a anticuerpos durante el tratamiento y/o conservación.

La bibliografía 1 no de patente sugiere que una preparación proteica de concentración elevada muestra un incremento en la viscosidad y en la turbidez, y la fuerza iónica afecta el grado. Además, la bibliografía 2 no de patente sugiere un método para estabilizar mediante secado por pulverización anticuerpos de concentración elevada.

Sin embargo, la bibliografía 1 no de patente no propone una solución fundamental para suprimir la viscosidad y turbidez de la preparación proteica de concentración elevada. Además, en el secado por pulverización descrito en la bibliografía 2 no de patente, asimismo se requiere un procedimiento de preparación complejo para la administración que impone una responsabilidad sobre el profesional en el campo médico, y asimismo surgen problemas respecto al riesgo de contaminación bacteriana debido a la manipulación, al igual que en la preparación liofilizada.

La preparación de disolución conocida de anticuerpo anti-CD40 es una preparación de disolución de anticuerpo 4D11 que se describe en la bibliografía 5 de patente, y se ha confirmado la estabilidad de esta preparación en una variedad de ensayos. Sin embargo, debido a que esta preparación tiene la concentración de anticuerpo de 10 mg/ml, es difícil de usar esta preparación como la preparación de disolución para administración subcutánea.

Bibliografías de la técnica anterior

Bibliografías de patente

- [Bibliografía 1 de patente] Publicación internacional WO 02/088186
- [Bibliografía 2 de patente] Publicación internacional WO 94/001547
- [Bibliografía 3 de patente] Publicación internacional WO 2005/063981
- [Bibliografía 4 de patente] Publicación internacional WO 1998/22136
- [Bibliografía 5 de patente] Publicación internacional WO 2005/063291
- [Bibliografía 6 de patente] WO 2007/124299
- [Bibliografía 7 de patente] US 2010/0278822

Bibliografías no de patente

- [Bibliografía 1 no de patente] Salinas BA et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, Volumen 99, Publicación 1, páginas 82-93, 2010
- [Bibliografía 2 no de patente] Bhas Dani et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, Volumen 96, Publicación 6, páginas 1504-1517, 2007

Descripción de la invención

Problemas que debe resolver la invención

En general, se espera que una preparación de disolución que contiene un anticuerpo de concentración elevada lleve a grandes mejoras en la aplicación clínica, tal como una mejora del método de administración (por ejemplo, administración subcutánea), un intervalo prolongado de administración, o similar, y contribuya enormemente a la mejora de la eficacia terapéutica o al cumplimiento del paciente. Mientras tanto, la producción de la preparación que contiene un anticuerpo de concentración elevada va acompañada de los problemas tales como la aparición de turbidez o materia extraña insoluble o similar, pero no se ha encontrado un método de mejora universal.

Como se describe anteriormente, se espera que el anticuerpo antagonista anti-CD40, 4D11G4PE, sea un fármaco de anticuerpo terapéutico para la supresión inmunitaria con el trasplante de órganos, o para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. En consecuencia, un objetivo de la presente invención es proporcionar una preparación de disolución de concentración elevada de 4D11G4PE, en la cual se suprima la aparición de turbidez o materia extraña insoluble atribuida a anticuerpos hasta un nivel equivalente al de la preparación de baja concentración convencional.

Medios para resolver los problemas

Se ha descubierto que cuando la preparación de disolución que contiene un anticuerpo antagonista anti-CD40 de concentración elevada tiene una concentración específica de tensioactivo y pH en un intervalo específico, se puede suprimir la aparición de turbidez o materia extraña insoluble atribuida a los anticuerpos hasta un nivel equivalente al de la preparación de baja concentración convencional, completando de ese modo la presente invención.

Esto es, la presente invención incluye las invenciones de (1) a (5) a continuación como la preparación de fármaco de anticuerpo terapéutico útil desde el punto de vista médico.

- 5 (1) Una preparación de disolución acuosa que comprende glutamato sódico en una concentración de 10 mM, sorbitol, polisorbato 80 en una concentración de 0.5 mg/ml a 2.0 mg/ml, y un anticuerpo anti-CD40 en una concentración de 100 mg/ml a 120 mg/ml, en el que la preparación de disolución tiene un pH de 4.75 a 4.8, y el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de Q en la posición 27 a K en la posición 474 en SEC ID N°: 1, y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de A en la posición 23 a C en la posición 235 en SEC ID N°: 2, en la que la disolución es de 200 a 400 mOsm.
- 10 (2) La preparación de disolución acuosa según el apartado 1, en la que la concentración de polisorbato 80 es 1.0 mg/ml.
- (3) La preparación de disolución acuosa según uno cualquiera de los apartados 1 a 2, en la que la concentración de anticuerpo es 100 mg/ml.
- 15 (4) La preparación de disolución acuosa según uno cualquiera de los apartados anteriores, en la que el sorbitol es D-sorbitol.
- (5) La preparación de disolución acuosa según uno cualquiera de los apartados anteriores, en la que la concentración de anticuerpo es 100 mg/ml, en la que el pH es 4.8, en la que la concentración de polisorbato 80 es 1.0 mg/ml, y en la que el sorbitol es D-sorbitol en una concentración de 262 mM.
- 20

La invención se define mediante las reivindicaciones, y cualesquiera otros aspectos o formas de realización expuestos en la presente memoria que no están comprendidos dentro del alcance de las reivindicaciones son únicamente a título informativo.

25

Se describe en la presente memoria además:

- 30 (1) Una preparación de disolución que comprende ácido glutámico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, polisorbato 80 de aproximadamente 0.5 mg/ml o más y aproximadamente 2.0 mg/ml o menos, y un anticuerpo de aproximadamente 50 mg/ml o más y aproximadamente 200 mg/ml o menos, en el que la preparación de disolución tiene pH de aproximadamente 4.6 a aproximadamente 5.0, y el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de Q en la posición 24 a K en la posición 474 en SEC ID N°: 1, y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de A en la posición 23 a C en la posición 235 en SEC ID N°: 2.
- 35 (2) La preparación de disolución descrita en (1) anterior, en la que la concentración de anticuerpo es aproximadamente 100 mg/ml o más y aproximadamente 120 mg/ml o menos.
- (3) La preparación de disolución descrita en (1) o (2) anterior, en la que el ácido glutámico o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo es glutamato de sodio.
- 40 (4) La preparación de disolución descrita en uno cualquiera de (1) a (3) anteriores, en la que la concentración de polisorbato 80 es aproximadamente 1,0 mg/ml.
- 45 (5) La preparación de disolución descrita en uno cualquiera de (1) a (4) anteriores, en la que la concentración del anticuerpo es aproximadamente 100 mg/ml.
- (6) La preparación de disolución descrita en uno cualquiera de (1) a (5) anteriores, en la que el pH es de aproximadamente 4.75 a aproximadamente 4.8.
- 50 (7) La preparación de disolución descrita en uno cualquiera de (1) a (6) anteriores, que comprende además un agente isotónico.
- (8) La preparación de disolución descrita en (7) anterior, en la que el agente isotónico es una sal o un azúcar.
- 55 (9) La preparación de disolución descrita en (8) anterior, en la que el agente isotónico es un azúcar no reductor.
- (10) La preparación de disolución descrita en (9) anterior, en la que el azúcar no reductor es sorbitol.
- 60

Efecto de la invención

En la preparación de disolución de la presente invención, la aparición de turbidez o de materia extraña insoluble atribuida a la concentración elevada del anticuerpo 4D11G4PE se puede suprimir hasta un nivel equivalente al de una preparación de disolución de baja concentración. En particular, incluso cuando la preparación de disolución de la presente invención se almacena a 25°C durante 1 mes o 3 meses, la aparición de turbidez o de materia extraña

65

insoluble atribuida a anticuerpos durante el período de conservación se puede suprimir hasta un nivel equivalente al de la preparación de disolución de baja concentración.

Formas de realización para poner en práctica la invención

5 En la presente memoria en adelante, la presente invención se describirá con detalle.

10 En la presente descripción, la expresión “preparación de disolución” se refiere a una preparación en la que un anticuerpo que tiene un efecto terapéutico se disuelve en una disolución farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de la disolución pueden incluir una disolución acuosa o una disolución no acuosa, preferentemente una disolución acuosa, y más preferentemente una disolución acuosa para inyección.

15 El “anticuerpo” usado en la preparación de disolución de la presente invención es un anticuerpo antagonista anti-CD40 que incluye una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de Q en la posición 27 a K en la posición 474 en SEC ID nº 1, y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de A en la posición 23 a C en la posición 235 en SEC ID nº 2 (asimismo denominado “4D11G4PE”). A continuación se muestran las secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 y 2.

SEQ ID NO: 1 Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe
 Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly
 Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
 20 Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 Gly Ser Ile Tyr Lys Ser Gly Ser Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
 Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
 Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Val Val Arg Tyr Phe Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala AlaLeu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 AlaVal Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His LysPro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
 Pro Ser Val Phe Lcu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Lcu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly LysGlu Tyr Lys Cys
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu LysThr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp LysSer Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 Lys

SEQ ID NO: 2 Met Asp Met Arg Val Pro AlaGln Leu Leu Gly Leu Leu Leu
 Leu Trp Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu
 AlaTrp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu
 Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Thr
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile LysArg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 Phe Tyr Pro Arg Glu AlaLys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 Leu Ser Lys AlaAsp Tyr Glu Lys His LysVal Tyr AlaCys Glu Val Thr His Gln Gly Leu
 Ser Ser Pro Val Thr LysSer Phe Asn Arg Gly Glu Cys

- 5 El anticuerpo 4D11G4PE usado en la preparación de disolución de la presente invención se puede preparar fácilmente por aquellos expertos en la materia usando el método conocido en la técnica, sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus cadenas pesada y ligera. En la bibliografía 3 de patente se describe el método ejemplificativo para preparar el anticuerpo.
- 10 La concentración del anticuerpo incluido en la preparación de disolución de la presente descripción es aproximadamente 50 mg/ml o más y aproximadamente 200 mg/ml o menos, preferentemente, aproximadamente 80 mg/ml o más y aproximadamente 150 mg/ml o menos, y más preferentemente, aproximadamente 100 o más y aproximadamente 120 mg/ml o menos. Específicamente, puede ser, por ejemplo, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml aproximadamente 110 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, o aproximadamente 200 mg/ml.
- 15
- 20 La preparación de disolución de la presente descripción incluye como agente amortiguador ácido glutámico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El ácido glutámico o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo que se va a utilizar se puede ejemplificar mediante ácido glutámico, glutamato sódico, glutamato potásico, glutamato de lisina, glutamato de arginina, hidrocloreto de glutamato, o similar, y preferentemente, ácido glutámico o glutamato sódico. El agente amortiguador se puede usar solo o en combinación de dos o más. La concentración de ácido glutámico o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo que se va a utilizar se puede ajustar según su capacidad amortiguadora o similar, y por ejemplo, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, y preferentemente, aproximadamente 10 mM.
- 25
- 30 El pH de la preparación de disolución de la presente descripción se puede ajustar a desde aproximadamente 4.6 hasta aproximadamente 5.0, y preferentemente, a desde aproximadamente 4.75 hasta aproximadamente 4.8.
- 35 La preparación de disolución de la presente invención incluye polisorbato 80 (monooleato de polioxietilensorbitán) como "tensioactivo". La concentración de polisorbato 80 en la preparación de disolución de la presente invención es de 0.5 mg/ml a 2.0 mg/ml, y preferentemente, aproximadamente 1.0 mg/ml.
- 40 La preparación de disolución de la presente descripción puede incluir uno, o dos o más de aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como un agente isotónico, un estabilizante, un conservante, un agente de suspensión, un agente emulsionante, o similar, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el "agente isotónico" se puede usar para ajustar una presión osmótica de manera que la preparación de disolución de la presente invención tenga la presión osmótica sustancialmente idéntica a la de la sangre humana. El agente isotónico que se va a utilizar no está particularmente limitado, en tanto que haga que la preparación de disolución tenga la presión osmótica sustancialmente idéntica a la de la sangre humana, y los ejemplos incluyen una sal y un azúcar.
- 45 La "sal" usada como el agente isotónico es un compuesto que se produce a través de la neutralización de cargas mediante iones positivos y negativos. Los ejemplos de la sal pueden incluir cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, cloruro magnésico, hidrogenosulfito de sodio, bromuro de calcio, bromuro de sodio, o similar.
- El "azúcar" usado como el agente isotónico es un hidrato de carbono representado por $C_n(H_2O)_m$, o un derivado del mismo (por ejemplo, alcohol polihidroxilado obtenido reduciendo el grupo carbonílico del azúcar, y aldosa y

cetosa generadas a partir de alcohol polihidroxilado), y un polímero purificado a partir del hidrato de carbono y/o del derivado.

5 Los ejemplos del azúcar pueden incluir manitol, inositol, glucosa, sorbitol, fructosa, lactosa, xilosa, manosa, maltosa, rafinosa, sacarosa, y trehalosa.

10 El agente isotónico usado en la preparación de disolución de la presente descripción es preferentemente un azúcar, y más preferentemente, un azúcar no reductor. El "azúcar reductor" es un azúcar que tiene un grupo aldehído o un grupo cetona que sirve como agente reductor en una disolución acuosa, y el azúcar no reductor es un azúcar que no es el azúcar reductor.

Los ejemplos del azúcar no reductor pueden incluir sorbitol, manitol, inositol, sacarosa y trehalosa. Entre ellos, se prefiere sorbitol, y es más preferido D-sorbitol.

15 La concentración del agente isotónico en la preparación de disolución de la presente descripción no está particularmente limitada, en tanto que la preparación de disolución de la presente descripción sea isotónica. La preparación de disolución incluye otras sustancias que tienen la capacidad isotónica, tal como un agente amortiguador o un antioxidante. De este modo, con respecto a la concentración del agente isotónico en la preparación de disolución, la concentración total de todas las sustancias se ajusta preferentemente a de 200 a 400 mOsm en la preparación de disolución.

20 La preparación de disolución de la presente invención se almacena típicamente en forma de una disolución acuosa, y se administra preferentemente tal como está. Además, la preparación de disolución de la presente invención puede ser una disolución antes de la preparación de una preparación liofilizada, o una disolución tras la disolución y reconstitución de la preparación liofilizada. Además, la preparación de disolución de la presente invención puede ser una disolución (sustancia farmacéutica) que es una materia prima para preparar la preparación de disolución.

25 En la presente memoria en adelante se describirán los términos con respecto a la preparación de disolución de la presente invención.

30 (1) "Turbidez"

35 En la preparación de disolución de la presente invención, la "turbidez" se refiere a partículas finas de un tamaño que no se puede determinar visualmente como partículas. La transmitancia de luz se reduce debido a que la luz es dispersada en la disolución por la turbidez. De este modo, es posible evaluar el grado de turbidez mediante observación visual.

En la presente invención, la turbidez se evalúa sobre la base de los siguientes criterios.

40 Clasificación de la turbidez "-": Cuando observada en la luminosidad de 5000 lux, la turbidez no puede ser reconocida por el inspector.

45 Clasificación de la turbidez "±": Cuando observada en la luminosidad de 5000 lux, se puede reconocer una turbidez muy ligera por el inspector.

Clasificación de la turbidez "+": Cuando observada en la luminosidad de 5000 lux, se puede reconocer una ligera turbidez por el inspector.

50 Clasificación de la turbidez "2+": Cuando observada en la luminosidad de 5000 lux, la turbidez puede ser fácilmente reconocida por el inspector.

55 Clasificación de la turbidez "3+": Cuando observada en la luminosidad de 5000 lux, la turbidez puede ser reconocida fácilmente por el inspector, y cuando es observada en la luminosidad de 200 lux (bajo luz dispersada en interior), se puede reconocer la turbidez.

La turbidez es causada por esfuerzo tal como calor, luz, vibración, o similar, o la presencia de otras sustancias que desestabilizan las moléculas del anticuerpo.

60 (2) "Materia extraña insoluble"

En la preparación de disolución de la presente invención, la "materia extraña insoluble" se refiere a partículas finas de un tamaño que se puede determinar visualmente como partículas. Es posible evaluar la aparición de materia extraña insoluble examinando el tamaño y/o el número de partículas finas mediante observación visual.

65 En la presente invención, la materia extraña insoluble se evalúa sobre la base de los siguientes criterios.

Clasificación de la materia extraña insoluble “-”: Cuando observada en la luminosidad de 5000 lux, la materia extraña no puede ser reconocida por el inspector.

5 Clasificación de la materia extraña insoluble “±”: Cuando observada en la luminosidad de 5000 lux, el inspector puede reconocer muy ligeramente una pequeña cantidad de materia flotante determinada como la materia extraña pequeña.

10 Clasificación de la materia extraña insoluble “+”: Cuando observada en la luminosidad de 5000 lux, el inspector puede reconocer ligeramente la materia extraña mínima.

Clasificación de la materia extraña insoluble “++”: Cuando observada en la luminosidad de 5000 lux, el inspector reconoce la materia extraña fácilmente detectable, pero cuando se observa en la luminosidad de 1000 lux, el inspector no reconoce la materia extraña fácilmente detectable.

15 Clasificación de la materia extraña insoluble “+++”: Cuando observada en la luminosidad de 1000 lux, el inspector reconoce la materia extraña fácilmente detectable.

20 Con respecto a la materia extraña insoluble, el tamaño y/o el número de partículas se pueden incrementar por esfuerzo tal como calor, luz, vibración, o similar, o por la presencia de otras sustancias que desestabilizan las moléculas del anticuerpo.

25 Cuando la preparación de disolución de la presente invención se almacena a 25°C durante 1 mes o 3 meses, tanto las clasificaciones de la materia extraña insoluble y de la turbidez en la preparación de disolución están por debajo de +.

30 Preferentemente, cuando la preparación de disolución de la presente invención se almacena a 25°C durante 1 mes, tanto las clasificaciones de la materia extraña insoluble como de la turbidez en la preparación de disolución están por debajo de +, y cuando la preparación de disolución se almacena a 25°C durante 3 meses, ambas clasificaciones de la materia extraña insoluble y de la turbidez en la preparación de disolución están por debajo de +. Más preferentemente, cuando la preparación de disolución se almacena a 25°C durante 1 mes, la clasificación de la materia extraña insoluble en la preparación de disolución está por debajo de ± y la clasificación de la turbidez en la preparación de disolución está por debajo de +, y cuando la preparación de disolución se almacena a 25°C durante 3 meses, la clasificación de la materia extraña insoluble en la preparación de disolución está por debajo de ± y la clasificación de la turbidez en la preparación de disolución está por debajo de +.

35 **Ejemplos**

40 La presente invención se pondrá más claramente de manifiesto mediante los siguientes ejemplos experimentales. Sin embargo, el alcance de la invención no está limitada a estos ejemplos experimentales.

40 **Ejemplo experimental 1; examen de pH**

45 Para evaluar el efecto del pH sobre la materia extraña insoluble y sobre la turbidez en la preparación de disolución que contiene un anticuerpo de concentración elevada (4D11G4PE), se prepararon las muestras 1 a 4 (muestras 1 a 3 “comparación”, muestra 4 “ejemplo 1”) (tabla 1).

[Tabla 1]

Lista de preparación de disolución				
	Concentración de 4D11G4PE (mg/ml)	pH	Concentración de polisorbato 80 (mg/ml)	Aditivo distinto de polisorbato 80 (concentración)
Muestra 1 (comparación)	10	5.25	0.05	Glutamato sódico (10 mM)
Muestra 2 (comparación)	100		0.05	
Muestra 3 (comparación)			1.0	D-sorbitol (262 mM)
Muestra 4 (ejemplo 1)		4.8	1.0	

50 La muestra 1 es una preparación de disolución que contiene un 4D11G4PE de baja concentración (10 mg/ml) para administración intravenosa. En la muestra 1, los aditivos distintos del anticuerpo y sus concentraciones fueron los mismos que en aquellos en la preparación de baja concentración de 4D11 que se describe en el ejemplo 5 de la bibliografía 5 de patente. La muestra 1 se usó como una comparación para una preparación de concentración elevada.

(1) Material y método

4D11G4PE se preparó según la descripción de la bibliografía 3 de patente. Previamente se preparó para cada muestra una disolución de placebo que no contiene 4D11G4PE, y cada preparación se preparó sustituyendo la disolución de placebo por la disolución que contiene 4D11G4PE usando una membrana de ultrafiltración (fabricada por Millipore Corp.) y concentrando entonces 4D11G4PE usando la misma membrana de ultrafiltración. Además, la concentración de 4D11G4PE en cada muestra se ajustó mediante conversión usando el coeficiente de absorción (ϵ) a OD280 nm = 1.4.

La filtración aséptica de cada muestra se llevó a cabo usando un filtro de 0.22 μ m (fabricado por Millipore Corp.) en un banco limpio, y viales de vidrio de 5 ml (de acuerdo con la Farmacopea Japonesa) se rellenaron cada uno con 1 ml de la muestra en el banco limpio mientras se mantiene la esterilidad.

(2) Condiciones de ensayo

Cada muestra se sometió a esfuerzo según las siguientes condiciones, para llevar a cabo la evaluación de la materia extraña insoluble y de la turbidez en este ejemplo experimental.

Ensayo de estabilidad al calor: Las muestras se almacenaron en una incubadora (fabricada por TABAI ESPEC) controlada a 25°C durante 1 mes o 3 meses.

Además, cada muestra se almacenó en un recipiente de baja temperatura controlado a 5°C hasta el comienzo del análisis tras la provisión de cada esfuerzo.

(3) Análisis

El análisis de la materia extraña insoluble y de la turbidez se llevó a cabo según las clasificaciones descritas anteriormente de materia extraña y de turbidez.

(4) Resultados

Los resultados se muestran en la tabla 2.

[Tabla 2]

Resultados del ensayo de materia extraña insoluble y de turbidez				
	Objeto del análisis	Inicial	25°C durante 1 mes	25°C durante 3 meses
Muestra 1 (comparación)	Materia extraña insoluble	±	±	±
	Turbidez	+	+	+
Muestra 2 (comparación)	Materia extraña insoluble	±	+++	+++
	Turbidez	2+	3+	3+
Muestra 3 (comparación)	Materia extraña insoluble	±	+++	+++
	Turbidez	2+	3+	3+
Muestra 4 (ejemplo 1)	Materia extraña insoluble	-	±	±
	Turbidez	+	+	+

Como se muestra en la tabla 2, cuando la concentración del anticuerpo fue 10 mg/ml y el pH fue 5.25 (muestra 1), el nivel de materia extraña insoluble fue ± y el nivel de turbidez fue +. Sin embargo, cuando la concentración del anticuerpo aumentó hasta 100 mg/ml (muestra 2), los niveles de materia extraña insoluble y de turbidez aumentaron hasta +++ y 3+, respectivamente.

Además, cuando la concentración de polisorbato 80 aumentó hasta 1.0 mg/ml a pH de 5.25 (muestra 3), no se pudieron disminuir los niveles de materia extraña insoluble ni de turbidez. Mientras tanto, cuando la concentración de polisorbato 80 aumentó hasta 1.0 mg/ml y el pH se disminuyó adicionalmente hasta 4.0 (muestra 4), el nivel de materia extraña insoluble disminuyó hasta ± y el nivel de turbidez disminuyó hasta +, que fueron los mismos niveles como en la muestra 1.

Ejemplo experimental 2: Examen de la concentración de tensioactivo

Para evaluar el efecto de la concentración del tensioactivo sobre la materia extraña insoluble y sobre la turbidez

en una preparación de disolución que contiene un anticuerpo de concentración elevada (4D11G4PE), se prepararon las muestras 5 a 7 (ejemplos 2 y 3, comparación) (tabla 3).

[Tabla 3]

5

Lista de preparación de disolución				
	Concentración de 4D11G4PE (mg/ml)	pH	Concentración de polisorbato 80 (mg/ml)	Aditivo distinto de polisorbato 80 (concentración)
Muestra 5 (ejemplo 2)	100	4.75	0.5	Glutamato sódico (10 mM) D-sorbitol (262 mM)
Muestra 6 (ejemplo 3)			1.0	
Muestra 7 (comparación)			5.0	

(1) Material y método

Se usaron los mismos materiales y métodos como en el ejemplo experimental 1.

10

(2) Condiciones de ensayo

Cada muestra se sometió a esfuerzo según las siguientes condiciones, para llevar a cabo la evaluación de la estabilidad en este ejemplo experimental.

15

Ensayo de estabilidad al calor: Las muestras se almacenaron en una incubadora (fabricada por TABAI ESPEC) controlada a 25°C o 40°C durante 1 mes o 3 meses.

Además, cada muestra se almacenó en un recipiente de temperatura baja controlado a 5°C hasta el comienzo del análisis tras la provisión de cada esfuerzo.

20

(3) Análisis

El análisis se llevó a cabo de la misma manera como en el ejemplo experimental 1.

25

(4) Resultados

Los resultados se muestran en la tabla 4.

[Tabla 4]

30

Resultados del ensayo de materia extraña insoluble y de turbidez						
	Objeto del análisis	Inicial	25°C durante 1 mes	25°C durante 3 meses	40°C durante 1 mes	40°C durante 3 meses
Muestra 5	Materia extraña insoluble	+	+	+	+	++
	Turbidez	+	+	+	2+	2+
Muestra 6	Materia extraña insoluble	+	+	+	+	+
	Turbidez	+	+	+	2+	2+
Muestra 7	Materia extraña insoluble	+	+	+	+	+
	Turbidez	+	2+	2+	2+	2+

Como se muestra en la tabla 4, cuando la muestra que tiene la concentración de polisorbato 80 de 1.0 mg/ml (muestra 6) se almacenó a 25°C durante 1 mes y 3 meses, no se observaron cambios a lo largo del tiempo, y tanto el nivel de materia extraña insoluble como de turbidez se suprimieron hasta +. Además, cuando la concentración de polisorbato 80 se disminuyó hasta 0.5 mg/ml (muestra 5) y la muestra se almacenó a 25°C, no se observaron diferencias en los niveles. Estos resultados mostraron que no hubo ninguna diferencia en la estabilidad entre la preparación de disolución de la presente invención y el ejemplo comparativo (muestra 1), indicando que la preparación de disolución de la presente invención tiene estabilidad a un nivel equivalente al de la preparación de concentración baja.

35

40

Además, cuando la muestra que tiene la concentración de polisorbato 80 de 1.0 mg/ml (muestra 6) se almacenó a

40°C durante 1 mes y 3 meses, el nivel de materia extraña insoluble fue +, y el nivel de la turbidez fue 2+ en ambos casos. Mientras tanto, cuando la concentración de polisorbato 80 se incrementó hasta 5.0 mg/ml (muestra 7) y la muestra se almacenó a 40°C, no se observaron diferencias en los niveles. Es decir, los resultados del ensayo de estabilidad a 40°C durante 1 mes y 3 meses sugieren que no se observaron cambios en la estabilidad de la preparación de disolución de la presente invención a lo largo del tiempo, y fue relativamente estable.

Ejemplo experimental 3: Examen de la concentración de anticuerpo

Para evaluar el efecto de la concentración de anticuerpo sobre la materia extraña insoluble y sobre la turbidez en una preparación de disolución que contiene un anticuerpo de concentración elevada (4D11G4PE), se preparó la muestra 8 (ejemplo 4) (tabla 5).

[Tabla 5]

Lista de preparación			
	Concentración de 4D11G4PE (mg/ml)	pH	Aditivo (concentración)
Muestra 4 (ejemplo 1)	100	4.8	Glutamato sódico (10 mM) D-sorbitol (262 mM) Polisorbato 80 (1.0 mg/ml)
Muestra 8 (ejemplo 4)	120		

(1) Material y método

Se usaron los mismos materiales y métodos que en el ejemplo experimental 1.

(2) Condiciones de ensayo

Cada muestra se sometió a esfuerzo según las siguientes condiciones, para llevar a cabo la evaluación de estabilidad en este ejemplo experimental.

Ensayo de estabilidad al calor: Las muestras se almacenaron en una incubadora (fabricada por TABAI ESPEC) controlada a 25°C durante 1 mes.

Además, cada muestra se almacenó en un recipiente de temperatura baja controlado a 5°C hasta el comienzo del análisis tras la provisión de cada esfuerzo.

(3) Análisis

El análisis se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo experimental 1.

(4) Resultados

Los resultados se muestran en la tabla 6.

[Tabla 6]

Resultados del ensayo de materia extraña insoluble y de turbidez			
	Objeto del análisis	Inicial	25°C durante 1 mes
Muestra 4 (ejemplo 1)	Materia extraña insoluble	-	±
	Turbidez	+	+
Muestra 8 (ejemplo 4)	Materia extraña insoluble	-	-
	Turbidez	+	+

Como se muestra en la tabla 6, cuando las concentraciones del anticuerpo fueron 100 mg/ml y 120 mg/ml, no hubo grandes diferencias en las clasificaciones de la materia extraña insoluble y de la turbidez.

Listado de secuencias

<110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.

<120> Preparación de anticuerpo anti-CD40 muy concentrada

<130> W510176

<150> JP2011-031894

<151> 2011-2-17

<160> 2

5 <170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 474

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu
20 25 30

Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
35 40 45

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Trp
50 55 60

Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr
65 70 75 80

Lys Ser Gly Ser Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr
85 90 95

Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser
100 105 110

Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Val Val
115 120 125

Arg Tyr Phe Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
145 150 155 160

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val

15

ES 2 734 076 T3

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 465 470

<210> 2
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160

10

ES 2 734 076 T3

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

REIVINDICACIONES

- 5 1. Preparación de disolución acuosa que comprende glutamato sódico a una concentración de 10 mM, sorbitol, polisorbato 80 a una concentración de 0.5 mg/ml a 2.0 mg/ml, y un anticuerpo anti-CD40 a una concentración de 100 mg/ml a 120 mg/ml, en la que la preparación de disolución presenta un pH de 4.75 a 4.8, y el anticuerpo comprende una cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos de Q en la posición 27 a K en la posición 474 en SEC ID nº: 1, y una cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos de A en la posición 23 a C en la posición 235 en SEC ID nº: 2, en la que la disolución es de 200 a 400 mOsm.
- 10 2. Preparación de disolución acuosa según la reivindicación 1, en la que la concentración de polisorbato 80 es 1.0 mg/ml.
- 15 3. Preparación de disolución acuosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la concentración de anticuerpo es 100 mg/ml.
- 20 4. Preparación de disolución acuosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el sorbitol es D-sorbitol.
5. Preparación de disolución acuosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la concentración de anticuerpo es 100 mg/ml, en la que el pH es 4.8, en la que la concentración de polisorbato 80 es 1.0 mg/ml, y en la que el sorbitol es D-sorbitol a una concentración de 262 mM.