

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 30691 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 39/39; A61K 39/395**

(43) Date de publication :
01.09.2009

(21) N° Dépôt :
31580

(22) Date de Dépôt :
22.01.2009

(30) Données de Priorité :
29.06.2006 IT FI2006A000163

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/EP2007/056465 28.06.2007

(71) Demandeur(s) :
MENARINI INTERNATIONAL OPERATIONS LUXEMBOURG S.A., 1, AVENUE DE LA GARE L-1611 LUXEMBOURG (LU)

(72) Inventeur(s) :
FLEMMING, Jens ; GRÖGER, Karsten ; SCHMITZ, Reinhard ; MANZINI, Stefano

(74) Mandataire :
ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)

(54) Titre : **COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT UN ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPIQUE ANTI-CA-125 ET DE L'ALUMINIUM.**

(57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION CONCERNE UNE COMPOSITION PHARMACEUTIQUE POUR ADMINISTRATION PARENTÉRALE SOUS FORME DE VACCINS QUI COMPREND UN ANTICORPS MONOCLONAL ET UN DÉRIVÉ D'ALUMINIUM EN TANT QU'ADJUVANT.

COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT UN ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-IDIOTYPIQUE ANTI-CA-125 ET DE L'ALUMINIUM

ABREGE

La présente invention concerne une composition pharmaceutique pour administration parentérale sous forme de vaccins qui comprend un anticorps monoclonal et un dérivé d'aluminium en tant qu'adjuvant.

**COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES CONTENANT UN ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-
IDIOTYPIQUE ANTI-CA-125 ET DE L'ALUMINIUM**

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine de compositions pharmaceutiques pour administration sous forme de vaccins destinés à l'application parentérale.

ETAT DE LA TECHNIQUE

Comme on le sait, afin d'augmenter l'immunogénicité des vaccins prophylactiques ou thérapeutiques, l'utilisation des adjuvants, comme par exemple un composé d'aluminium, est généralement considérée (Fiejka et al. Roczn Państw Zakł Hig 1993, 73 - 80) dans la préparation des formes pharmaceutiques comme des solutions ou des suspensions pour l'administration parentérale. L'objectif de ces préparations doit être d'inciter un effet immunogène maximum et durable.

Toutefois, une quantité limitée d'adjuvants aluminium a été jusqu'à présent utilisée dans les vaccins enregistrés et commercialisés et, en fait, une limite de 1,25 mg / dose est établie dans le Ph.Eur.

Aussi FDA dans le 21 CFR 610.15 indique que la quantité de l'aluminium dans la dose individuelle recommandée d'un produit biologique ne doit pas dépasser:

- (1) 0,85 milligrammes si elle est déterminée par dosage ou
- (2) 1,14 milligrammes si elle est déterminée par calcul sur la base de la quantité du composé aluminium composé ajouté ou
- (3) 1,25 milligrammes déterminé par dosage à condition que les données démontrant que la quantité de l'aluminium utilisée est sans danger et nécessaire pour produire l'effet recherché.

L'immunogénicité des anticorps adsorbés en adjuvants aluminium semble dépendre du degré d'adsorption (Capelle et al. Vaccine 2005, 1686 - 1694), mais il est difficile de savoir quel est le meilleur ratio qui doit être utilisé pour atteindre une réponse immunitaire maximum tout en gardant une marge d'innocuité. Par exemple, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande une adsorption sur adjuvants aluminium aux niveaux anatoxine dépassant 80% pour les anatoxines tétanique et diphtérique (Gupta et al. Vaccine 1995, 1263 - 1276, WHO Technical Report Series n ° 595, 1996, p. 6). En revanche, les données montrent que l'adsorption de composants du tétanos en hydroxyde d'aluminium de niveaux supérieurs à 80% n'a pas pu améliorer la réponse immunitaire

chez l'adulte sain (Paoletti et al., Infect Immun 2001, 6696 - 6701). Le contenu le plus approprié d'un composé aluminium afin d'optimiser l'immunogénicité (sans risque inacceptable d'effets secondaires toxiques) d'un vaccin contenant un anticorps monoclonal est encore un problème technique ouvert.

Un autre problème technique est la stabilité des vaccins qui varie considérablement. Ils peuvent être classés en fonction de leur résistance à l'entreposage à des températures élevées, avec les anatoxines diphtérique et tétanique et le vaccin contre l'hépatite B présentant la plus grande thermo stabilité, le vaccin lyophilisé anti rougeole, anti amaril et BCG occupe la deuxième position et le vaccin antipoliomyélitique oral est le plus fragile (Galazka et al. Thermostabilité des vaccins, Organisation mondiale de la santé, 1998). Les vaccins reconstitués contre la rougeole, la fièvre jaune et la tuberculose (BCG), sont des vaccins instables; ils devraient être utilisés dès que possible après la reconstitution et être conservés dans un bain de glace au cours de la session d'immunisation. Bien que le tétanos et la diphtérie (par exemple, adsorbés sur des sels d'aluminium) en tant que vaccins monovalents ou des composants de vaccins combinés sont stables pendant des semaines à 35 -37 ° C, chaque exposition à la température ambiante entraîne une certaine dégradation du vaccin (Galazka et al, vide supra, page 48). Par conséquent pour ces types de vaccins "stables", le stockage à froid est prescrit (Rote Liste, Edition Cantor Verlag, 2005).

Le problème technique non résolu que pose ce type de vaccin contenant des anticorps monoclonaux, est la faible stabilité à des températures ambiantes.

En raison de la nature du principe actif de la protéine complexe, ces médicaments doivent être stockés dans des conditions froides (2 - 8 ° C) nécessitant une chaîne du froid constante. Cela entraîne des coûts de distribution plus élevés, met en danger la marge d'innocuité globale et, éventuellement plus important, limite l'utilisation à l'échelle mondiale de médicaments très bénéfiques comme un vaccin anticancéreux. Le développement de formulations de vaccins garantissant la qualité constante du médicament, même à température ambiante et des températures plus élevées (25 ° C - 37 ° C) est capable d'améliorer la marge d'innocuité et d'efficacité globale de ces médicaments. Ce serait non seulement très bénéfique pour les patients, mais conduirait également à une facilité de manipulation de ces médicaments précieux.

D'autre part, l'importance de l'immunothérapie dans le traitement de tumeurs chez l'homme et en particulier l'utilisation des anticorps monoclonaux anti idiotypiques en tant que vaccins thérapeutiques contre les tumeurs est bien connu.

Ces vaccins doivent activer le système immunitaire de l'hôte stimulant une humeur et une action cellulaire contre les tumeurs.

Le développement et la définition d'un tel type de formulation est particulièrement important pour ACA125/MEN2234 (décrit dans EP700305), un anticorps monoclonal anti-idiotypique très prometteur destiné à être utilisé comme un vaccin thérapeutique contre le carcinome de l'ovaire. Pour MEN2234 le Nom d'Index CA suivant a été attribué: immunoglobuline G1, anti-(souris OC 125) (mouse monoclonal ACA- 125clone 3D5 g-chain), disulfure avec mouse monoclonal ACA-125 clone 3D5 k-

chain, dimer. Le numéro d'enregistrement correspondant du CAS est 792921-10-9. La INN proposée est l'Abagovomab.

La séquence des acides aminés de MEN 2234 est présentée ci-après.

MEN 2234 est un anticorps monoclonal de souris généré contre l'anticorps monoclonal de souris OC125, qui reconnaît l'antigène associé aux tumeurs (TAA) CA125. MEN 2234 imite efficacement la structure tridimensionnelle de CA125 TAA et ainsi induit chez l'hôte la production d'anti-anticorps anti-anti-idiotypiques (Ab3) ciblant les cellules tumorales exprimant l'antigène CA125. MEN 2234 est également capable s'obtenir chez l'hôte une réponse immunitaire cellulaire dirigée spécifiquement contre les cellules tumorales CA125.

Environ 80% des patients à un stade avancé de cancer de l'ovaire présente une expression élevée de CA125. Bien que CA125 soit surexprimée dans le cancer de l'ovaire, l'organisme humain lui-même n'est pas capable de monter une réponse immunitaire efficace contre ces cellules cancéreuses. Le traitement avec un vaccin thérapeutique contenant MEN 2234 devrait être en mesure de réveiller le système immunitaire de l'hôte pour attaquer et détruire les cellules disséminées du cancer de l'ovaire. EP700305 décrit les anticorps monoclonaux anti-idiotypiques anti-CA125, toutefois il ne décrit aucune formulation pharmaceutique spécifique appropriée pour le traitement des pathologies. Dans le *Hybridoma*, 1995, 14 (2), 164-174, les anticorps ACA-125 a été caractérisé, mais aucune formulation n'a été développée.

Dans le *Clinical Cancer Research*, 2004, 10, 1580-1587, la vaccination des patients présentant le ACA125 a été effectuée, aucune indication sur la concentration de l'aluminium dans la formulation n'a été divulguée, mais un homme de métier, sur la base de l'état de la technique, pourrait facilement imaginer une concentration relativement faible de l'aluminium comme adjuvant (inférieure à 1,25 mg par dose simple).

Dans le *Hybridoma*, 2005, 133-140, on décrit un dispositif d'administration continue pour le déblocage endogène de ACA125hFc (une forme chimérique d'ACA 125) pour améliorer l'immunogénicité comme vaccins contre le cancer de l'ovaire, mais ils ont généré un dépôt in vitro sur la base de la technologie de la bioencapsulation.

En outre, la publication résume les résultats des études précliniques et cliniques sur les vaccins contre le cancer de l'ovaire y compris le MEN2234 mais des données concrètes sur la formulation ou la concentration utilisée des adjuvants ne sont pas mentionnées (par exemple, un composé d'aluminium, n'est pas cité): *Clinical Cancer Research*, 2004, 1580-1587; *Clinical Cancer Research*, 2003, 3234-3240; *Clinical Cancer Research*, 2001, 1154-1162; *Clinical Cancer Research*, 2001, 1112-1115).

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

L'invention revendique une formulation pharmaceutique pour application parentérale (de préférence sous-cutanée ou intramusculaire) contenant l'anticorps monoclonal anti-idiotypique MEN2234 adsorbé sur un composé aluminium choisi parmi l'hydroxyde d'aluminium (alum) ou le phosphate d'aluminium, et en suspension dans un système aqueux tamponné.

L'utilisation de concentrations élevées (bien au-delà de celles habituellement examinées et recommandées) d'un composé d'aluminium comme adjuvant donne un vaccin avec des avantages cliniques et pharmaceutiques inattendus tels que:

- I. La garantie d'une immunogénicité élevée extraordinaire pour les réponses humorales et cellulaires respectivement
- II. La garantie d'une induction et maintien prolongés d'une réponse immunitaire
- III. La garantie la sécurité de l'administration du médicament;
- IV. La simplification du procédé de fabrication et de déblocage pour le médicament final;
- V. Une plus grande cohérence dans les processus de fabrication
- VI. L'amélioration de la stabilité du médicament aussi à des gammes de température.

Des compositions pharmaceutiques selon l'invention contenant l'anticorps anti-idiotypique MEN2234 à une quantité qui varie entre 0,1 mg / ml à 4 mg / ml, de préférence 0,2 mg / ml à 2,5 mg / ml, encore plus de préférence à une concentration d'environ 2 mg / ml (de 1,9 à 2,1 mg / ml). L'anticorps MEN2234 est adsorbé sur un composé d'aluminium (de préférence à une concentration d'environ 3,5 mg / ml de l'aluminium) et suspendu dans une solution saline tamponnée et isotonique. Ces compositions n'ont pas besoin d'autres ingrédients en plus des anticorps adsorbés sur les composés d'aluminium et les sels tampons, ce qui représente une solution très simple dépourvue de toute préoccupation de sécurité qui pourrait découler de l'utilisation d'autres agents tels que les stabilisants, les antioxydants, et d'autres adjuvants, etc.

Les tampons préférés sont ceux obtenus avec les sels de citrate ou de phosphate. La composition finale contient de préférence 1 ml du produit à administrer par voie parentérale, de préférence par injection sous-cutanée ou intramusculaire.

Une des principales caractéristiques de la présente invention est que la concentration relativement élevée d'un composé d'aluminium, choisi parmi le phosphate d'aluminium et l'hydroxyde d'aluminium, est nécessaire pour assurer une quasi complète adsorption de MEN2234 sur l'adsorbant, l'hydroxyde d'aluminium étant fortement préféré (ref. Tableau 1).

La meilleure concentration de l'aluminium Al^{+++} dans les compositions se situe dans l'étendue 2.4-5.2 mg / ml, de préférence environ 3,5 mg / ml (dans l'étendue 3.1-3.8 mg / ml). Ce qui correspond à une teneur en hydroxyde d'aluminium à l'ordre de 0,7 -1,5% W / W, de préférence environ 1% W/W (dans l'étendue 0,9-1,1%)

Tableau 1: Dépendance de l'adsorption de MEN2234 (protéine non adsorbée) sur la concentration en aluminium (hydroxyde d'aluminium)

Concentration		Protéine Non Adsorbée [%]
Al ⁺⁺⁺ [mg/ml]	Al (OH) ₃ [%]	
0	0	100
0.9	0.25	78
1.2	0.36	59
1.7	0.5	30
2.6	0.75	<1.0
3.5	1.0	<0.1
6.9	2.0	<0.1

Le contenu de l'hydroxyde d'aluminium 1% correspond à env. 3,5 mg d'aluminium Al⁺⁺⁺ par ml, donc bien au-dessus du contenu utilisé actuellement dans les vaccins enregistrés et commercialisés et généralement recommandés par les autorités.

Ces formulations peuvent être préparées selon les procédures standards bien connues dans l'art. Un procédé général qui peut être utilisé est le suivant. La fabrication du produit final sera effectuée par le mélange de la solution d'anticorps et de l'adjuvant (un gel du composé d'aluminium) dans des conditions définies. Le médicament doit répondre aux exigences de stérilité selon la monographie Ph. Eur. « La préparation parentérale ». Par conséquent, selon les exigences réglementaires, le procédé de fabrication sera strictement effectué dans des conditions d'asepsie. Tous les ingrédients utilisés sont stériles ou sont filtrés à travers un filtre de 0,22 micromètre, sous la forme d'une solution lors de la fabrication.

Les formulations selon la présente demande montrent un groupe cohérent d'avantages:

I. La garantie d'une immunogénicité élevée extraordinaire à la fois pour la réponse humorale et cellulaire

Nous avons démontré que le traitement mensuel (administration s.c par quatre semaines) de la composition de la matière de la présente invention est capable d'induire une réponse humorale spécifique (anticorps spécifique dirigé contre MEN2234) à une quantité qui dépend de la concentration du composé de l'aluminium. En fait, il a été démontré que le degré de la réponse humorale obtenu par la formulation avec 1% de l'hydroxyde d'aluminium (exemple 1) est significativement supérieure à celle obtenue par une suspension contenant de l'hydroxyde d'aluminium 0,36% (correspondant à la limite indiquée par Ph.Eur, et FDA) ou par une solution de MEN2234 saline tamponnée:

Tableau 2: Titres de Plasma des anticorps contre la MEN2234 mesurés dans le plasma de lapin suivant des administrations sc à 4 semaines

Formulation	Titre de l'anticorps (ng/ml)
MEN 2234 solution	907 \pm 259
MEN 2234 suspension dans Al(OH) ₃ à 0.36 %	3658 \pm 1473
MEN 2234 suspension dans Al(OH) ₃ à 1.0 %	15627 \pm 5007 *

- P < 0,05 vs les deux autres conditions (test de comparaison multiple de Bonferroni)

En outre, une évaluation histologique a été effectuée aux lieux d'injection afin de mesurer le recrutement de cellules inflammatoires et de cellules présentatrices d'antigène nécessaire à la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire. Aussi, pour ce paramètre, la réponse à la formulation avec 1% de l'hydroxyde d'aluminium (exemple 1) a été remarquablement supérieure à celle obtenue avec une suspension à contenu inférieur Al (OH) 3 (0,36%) ou une solution MEN2234 sans Al (OH) 3:

Tableau 3: détection semi-quantitative des cellules inflammatoires dans les lieux d'injection chez les lapins traités par les vaccins sur une base hebdomadaire

Formulation	Densité des cellules inflammatoires
MEN 2234 solution	+/-
MEN 2234 suspension dans Al(OH) ₃ à 0.36 %	++
MEN 2234 suspension dans Al(OH) ₃ à 1.0 %	+++

II. La garantie d'une d'induction et maintien prolongés d'une réponse immunitaire

Chez le lapin, nous avons démontré que, suite à l'immunisation (4 injections hebdomadaires) avec la composition de la matière dans l'exemple 1, la réponse immunitaire est maintenue pour une plus longue période et même après plusieurs semaines des anticorps spécifiques sont mesurables dans le plasma. D'autre part, lorsque l'immunisation est réalisée avec la suspension MEN2234 à faible quantité de Al (OH) 3 (0,36%) ou avec MEN2234 comme une solution sans adjuvant, la présence des anticorps est détectable pour une courte période de temps:

III. La garantie de la sécurité de l'administration de médicaments

La matière de la suspension MEN2234 de la présente invention a été administrée, comme injections par voie sous cutanée à une dose de 2 mg / ml, jusqu'à 26 semaines chez le lapin. Le régime d'administration a été hebdomadaire le premier mois, ensuite bihebdomadaire dans le reste de la période. La tolérance locale et la sécurité systémique ont été évaluées. Même après 15 traitements aucun effet toxique n'a été enregistré en termes de : poids corporel, signes cliniques, consommation

alimentaire, hématologie, chimie clinique et histopathologie de tous les organes. Sur le lieu d'injections, il n'a été observé que les réponses inflammatoires et immunologiques comme conséquence de l'action pharmacologique du médicament.

En outre, cette invention permettant une quantité réduite d'anticorps murins libres va également diminuer l'absorption et le pic dans la circulation systémique réduisant ainsi le risque de réaction anaphylactique (s).

IV. Simplification du procédé de la fabrication et du déblocage pour le médicament final

Environ 1% d'hydroxyde d'aluminium garantit une liaison complète MEN2234 (<1% anticorps non adsorbée). Il en résulte une adsorption et un procédé de fabrication très fort en évitant le besoin de tests de déblocage in-vivo (réponse immunogène chez les animaux de laboratoire) comme il est généralement requis pour de nombreux vaccins contenant de l'aluminium, comme le tétanos, la diphtérie. L'adsorption complète garantie une présentation optimale des anticorps (AB2) dans le système immunitaire de l'hôte.

Des investigations détaillées du MEN2234 - mécanisme d'adsorption de l'hydroxyde d'aluminium a révélé que près d'une distribution idéale stoechiométrique de ces deux substances est réalisée dans une solution phosphate tamponnée. Cela garantit, tel qu'il est mentionné précédemment, un procédé de fabrication simple et solide en raison des propriétés de l'auto assemblage de l'invention. Déjà après 15 sec de mixtion modérée, l'anticorps est presque adsorbé complètement sur hydroxyde d'aluminium (tableau 4).

Tableau 4: Dépendance de l'adsorption MEN2234 sur le temps de mixtion (concentration de l'hydroxyde d'aluminium 1%)

Temps de mixtion [min:sec]	Protéine Non Adsorbée [%]
0	100
0:10	0.20
0:30	0.20
1:00	0.15
5:00	0.20
15:00	0.03
240:00	0.10

Comme on l'a vu dans le tableau 1, avec la concentration d'adjuvant inférieure à 0,75%, aucune adsorption complète ne peut être obtenue; les concentrations supérieures à 1% (par exemple 2%) n'ont démontré aucune amélioration.

L'adsorption très rapide et complète de MEN2234 sur composés d'aluminium à des concentrations plus élevées de l'adsorbant à celles recommandées permet de simplifier remarquablement la fabrication de la composition comme un médicament. En quelques secondes, la formule finale est obtenue par simple mélange de l'anticorps monoclonal avec l'adjuvant. Cette étape de mélange peut être réalisée systématiquement en utilisant un équipement standard pour le traitement aseptique dans les laboratoires pharmaceutiques. Les caractéristiques de l'auto-assemblage du système décrit conduit à des perspectives entièrement nouvelles dans la fabrication et la stabilisation de cette formulation, ainsi que pour les anticorps monoclonaux adsorbés ou les vaccins en général. L'adsorption complète de MEN2234 en adjuvant d'aluminium dans des secondes pourrait également permettre la préparation de la suspension finale, immédiatement avant l'injection sc ou i.m. à travers le mélange de la quantité de la substance médicamenteuse avec l'adjuvant aluminium sur le lieu final de l'application chez les patients, par exemple, dans un hôpital.

par conséquent, un aspect particulier de la présente invention est représenté par une forme dans laquelle le principe actif du vaccin (l'anticorps MEN2234) et l'adjuvant (composé de l'aluminium, de préférence l'hydroxyde d'aluminium) sont séparés et prêts à être mélangés juste avant l'injection pour le patient. Le moment préféré pour cette étape de mélange doit être compris entre 10 secondes et 10 minutes avant l'administration au patient.

Pour cette forme particulière, la composition devrait être fournie avec l'anticorps et la solution d'adjuvant séparés les uns des autres, mais remplis dans des récipients standards de produits pharmaceutiques comme les flacons, les ampoules, les seringues pré-remplies ou les systèmes appropriés à deux chambres pour le mélange et / ou la reconstitution. L'anticorps monoclonal peut non seulement être utilisé sous la forme d'une solution tamponnée ultimement, mais également sous forme, par exemple, d'une poudre. La possibilité d'utiliser la substance médicamenteuse sous forme solide, permet d'appliquer l'ensemble des techniques destinées à améliorer la stabilité des anticorps monoclonaux ou des vaccins (lyophilisation, séchage par pulvérisation, etc.) Cela représente un progrès significatif dans la manutention et l'amélioration de la stabilité pour tous les vaccins adsorbés en général et, en particulier, pour ceux qui contiennent des anticorps monoclonaux tels que le MEN 2234. Les principaux inconvénients des vaccins adsorbés comme une chaîne du froid permanente pendant le transport et l'entreposage, peuvent être évités et la durée de validité du médicament peut être augmentée.

Tel qu'il est mentionné précédemment, l'activité immunogène in vivo des compositions pharmaceutiques contenant des anticorps monoclonaux dépend d'une manière variable du degré d'adsorption de l'anticorps sur les adsorbants utilisés (Capelle et al. Vaccine 2005, 1686 - 1694). Par conséquent, l'état de la technique consiste à déterminer l'activité biologique immunogène des vaccins (adsorbés) « in vivo » chez l'animal avant la mise en vente du produit médicamenteux. L'adsorption reproductible de MEN 2234 sur adjuvant aluminium simplifie le procédé de déblocage

considérablement. En raison de la fiabilité de l'adsorption, l'essai de déblocage pourrait recourir uniquement sur les tests in vitro pour déterminer la teneur de la composition. Le procédé habituel pour déterminer également l'activité biologique "in vivo" chez les animaux est, pour la composition de la présente invention, redondant.

V. L'amélioration de la cohérence dans la fabrication de produits médicamenteux

La reproductibilité dans l'adsorption de MEN 2234 adsorption en utilisant des concentrations plus élevées de, par exemple, l'hydroxyde d'aluminium que celles recommandées améliore de façon significative la cohérence dans la fabrication de produits médicamenteux. Comme le montre le tableau 5, si la concentration de l'hydroxyde d'aluminium dans les formulations est de l'ordre de 0,7 à 2% w/v l'adsorption de MEN 2234 est complète (<1% anticorps libre) pour tous les lots fabriqués.

Tableau 5: La variabilité de l'adsorption de MEN 2234 (anticorps non adsorbé) sur l'hydroxyde d'aluminium au cours de la fabrication

Concentration de l'hydroxyde d'aluminium [%]	Anticorps non-adsorbé [%]	
	Phase I	Phase II
0	100	100
0.25	78	36
0.36	59	11
0.5	30	6
0.75	< 1.0	< 1.0
1.0	< 0.1	< 0.1
2.0	< 0.1	< 0.1

L'adsorption complète et reproductible empêche en outre les complications à craindre au cours de la transformation comme la formation des agglomérats des anticorps. Anticorps dans la solution sont susceptibles de former des agrégats. Totalisation des anticorps dans la solution peut être induite par un excès de forces de cisaillement dans la phase liquide par exemple, lors de l'agitation. Ces agrégats ne peut être dissoute et conduit à une réduction significative de l'activité biologique du vaccin. Toutefois, en raison de la rapide et complète du processus d'adsorption de ce phénomène peut être évité totalement pour la composition objet de la présente invention.

VI. Amélioration de la stabilité médicament aussi les plages de température

Étonnamment, la composition de l'exemple 1 est de loin plus stable (même par 25 ° C et 37 ° C) par rapport à la solution tamponnée MEN2234. Cette simple mais très efficace moyenne (l'augmentation de la concentration de l'hydroxyde d'aluminium jusqu'à 2 ou 3 fois de la dose recommandée) assure

presque complète obligatoire et, en conséquence, également la stabilité. Dans le tableau 6 les données de stabilité concernées sont présentées pour MEN2234 dans la solution et formulées conformément à l'exemple 1.

Tableau 6: Données de stabilité pour MEN2234 dans la solution et adsorbées sur hydroxyde d'aluminium

Produit testé	Conditions de stockage [°C]	[%] Produit après une durée de stockage (mois)		
		0	1	2
solution MEN2234, lot K2CL73-P5	25	100.0	90.2	88.6
	37	100.0	88.9	89.1
MEN2234 adsorbé en 1 % hydroxide aluminium, lot 287-2p42	25	100.0	102.1	98.7
	37	100.0	98.7	100.4

En conséquence, l'invention assure la stabilité et l'activité requises de l'anticorps à des températures corporelles concernées (36 - 37 ° C) après l'administration chez l'homme.

Exemples

Les exemples non limitatifs de l'invention sont les suivants:

Exemple 1: suspension pour injection

Ingrédient	mg/ml
MEN2234	2.00
Al(OH) ₃ *	10.00
KCl	0.20
KH ₂ PO ₄	0.20
NaCl	8.00
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	2.16
Eau pour injections	ad 1.00 ml

* Utilisée pour la fabrication de l'hydroxyde d'aluminium, hydraté, pour adsorption

La composition a été préparée selon le procédé standard, tel qu'il est décrit préalablement, simplement en mélangeant MEN2234 avec une suspension d'hydroxyde d'aluminium, hydraté, dans une solution tamponnée avec les sels concernés.

Exemple 2: suspension pour injection

<i>Ingrédient</i>	<i>mg/ml</i>
MEN2234	2.00
Al(OH) ₃ *	7.50
KCl	0.20
KH ₂ PO ₄	0.20
NaCl	8.00
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	2.16
Eau pour injections	ad 1.00 ml

* Utilisée pour la fabrication de l'hydroxyde d'aluminium, hydraté, pour adsorption

Préparé comme dans l'exemple 1Exemple 3: suspension pour injection

<i>Ingredient</i>	<i>mg/ml</i>
MEN2234	2.00
AlPO ₄	10.00
KH ₂ PO ₄	0.20
<i>NaCl</i>	<i>9.00</i>
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	1.20
Eau for injections	ad 1.00 ml

Préparée comme dans l'exemple 1

Exemple 4: détermination de la séquence acid Aminée de MEN2234 (abagovomab).

SEQ. ID NO. 1

Séquence de la chaîne lourde

QVQXQQSGAE XARPGASVKX SCKASGYTFT NYWMQWVKQR PGQGDWDXGA XYPGDGNTRY 60
 TQKFKGKATX TADKSSSTAY MQXSSXASED SAVYYCARGE GNYAWFAYWG QGTXVTVSAA 120
 KTTPPSVYPX APGSAAQTNS MVTXGCXVKG YFPEPVTVTW NSGSXSSGVH TFAVXQSDX 180
 YTXSSSVTVP SSTWPSETVT CNVAHPASST KVDKXVPRD CGCKPCXCTV PEVSSVFXFP 240
 PKPKDVXTXT XTPKVTCVVV DXSKDDPEVQ FSWFVDDDEV HTAQTQPREE QFNSTFRSVS 300
 EXPXMHQDWX NGKEFKCRVN SAAFAPXEK TXSKTKGRPK APQVYTXPPP KEQMAKDKVS 360
 XTCMXTDFFP EDXTVEWQWN GQPAENYKNT QPXMDTDGSY FVYSKXNVQK SNWEAGNTFT 400
 CSVXHEGXHN HHTKXSXSHS PGK

SEQ. ID NO.2

Séquence de la chaîne légère

DIQMTQSPAS LSASVGETVT XTCRASENXY SYXAWHQKQ GKSPQXXVYN AKTXAGGVSS 60
RFSGSGSGTH FSXKXKSXQP EDFGXYYCQH HYGXFPTFGG GTKXEXKRAD AAPTVSXFPP 120
SSEQXTSGGA SVVCFXNNFY PKDXNVKWKX DGSERQNGVX NSWTDQDSKD STYSMSSTXT 180
XTKDEYERHN SYTCEATHKT STSPXVKSFN RNEC

Une première partie de la détermination de la séquence d'acides aminés dans abagovomab a été réalisée en utilisant les techniques de séquençage automatique en fonction du procédé de la dégradation d'Edman, dans un séquenceur de protéines, où abagovomab a été liée de manière covalente à la membrane de séquençage (15 premiers acides aminés de la chaîne légère). Etant donné que le séquençage d'Edman automatisé n'a pas été en mesure de produire les données de séquence de la chaîne lourde, ce qui suggère une modification du groupe N-terminal de la chaîne lourde à l'acide pyroglutamique, pour un séquençage plus long, les techniques les plus connues de séquençage LC / MS / MS ont été utilisées en utilisant la spectrométrie de masse (par exemple, Proc. Natl Acad Sci USA, 1986 Sep Sep, 83 (17), 6233-6237).

En bref, les différents échantillons d'anticorps ont été fragmentés avec différentes enzymes protéolytiques avant LC / MS / MS et l'analyse a donné plusieurs séries de fragments de séquence chevauchante. En trouvant le schéma de chevauchement de ces fragments, il a été possible de déterminer la séquence totale de la chaîne légère de l'anticorps (séquences d'acides aminés complètes de la chaîne lourde et légère sont indiquées dans SEQ. ID NO. 1 et SEQ. ID NO. 2).

Comme dernier contrôle de la fiabilité des résultats expérimentaux, les séquences signalées ont été également vérifiées par l'analyse de similarité entre séquence avec le logiciel BLAST contre une base de données de protéines non redondante optimisée pour l'analyse des protéines (MSDB, téléchargé en Mars 2007 du site de l'European Bioinformatics Institute ftp).

Puisque dans la spectrométrie de masse il est impossible de faire la distinction entre la leucine et l'isoleucine, dans la figure 1 cette indécision est représentée par "X".

PhoenixTemp27800.tmp.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Menarini International Operations Luxembourg S.A.
<120> Pharmaceutical compositions containing monoclonal anti idiotypic anti-CA-125 antibody and aluminium
<130> 7626 PTWO
<150> FI2006A000163
<151> 2006-06-29
<160> 2
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
<223> Monoclonal antibody

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (51)..(51)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (70)..(70)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (83)..(83)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (86)..(86)
<223> X is Leu or Ile

PhoenixTemp27800.tmp.txt

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (114)..(114)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (130)..(130)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (144)..(144)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (147)..(147)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (165)..(165)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (176)..(176)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (180)..(180)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (183)..(183)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (216)..(216)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (227)..(227)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (238)..(238)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (247)..(247)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (249)..(249)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (251)..(251)

PhoenixTemp27800.tmp.txt

<223> X is Leu or Ile
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (262)..(262)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (302)..(302)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (304)..(304)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (310)..(310)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (328)..(328)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (332)..(332)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (347)..(347)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (361)..(361)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (365)..(365)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (373)..(373)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (393)..(393)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (406)..(406)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (424)..(424)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE

PhoenixTemp27800.tmp.txt

<222> (428)..(428)

<223> X is Leu or Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (437)..(437)

<223> X is Leu or Ile

<400> 1

Gln Val Gln Xaa Gln Gln Ser Gly Ala Glu Xaa Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Xaa Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Xaa Asp Trp Xaa
35 40 45

Gly Ala Xaa Tyr Pro Gly Asp Gly Asn Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Xaa Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Xaa Ser Ser Xaa Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Glu Gly Asn Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Xaa Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
115 120 125

Pro Xaa Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Xaa
130 135 140

Gly Cys Xaa Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Xaa Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Xaa
165 170 175

Gln Ser Asp Xaa Tyr Thr Xaa Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Xaa Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys
210 215 220

Pro Cys Xaa Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Xaa Phe Pro
225 230 235 240

PhoenixTemp27800.tmp.txt

Pro Lys Pro Lys Asp Val Xaa Thr Xaa Thr Xaa Thr Pro Lys Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Xaa Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser
 260 265

Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Xaa Pro Xaa
 290 300

Met His Gln Asp Trp Xaa Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn
 305 310 315 320

Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Xaa Glu Lys Thr Xaa Ser Lys Thr Lys
 325 330 335

Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Xaa Pro Pro Pro Lys Glu
 340 345 350

Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Xaa Thr Cys Met Xaa Thr Asp Phe
 355 360 365

Phe Pro Glu Asp Xaa Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala
 370 375 380

Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Xaa Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr
 385 390 395 400

Phe Val Tyr Ser Lys Xaa Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly
 405 410 415

Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Xaa His Glu Gly Xaa His Asn His His
 420 425 430

Thr Glu Lys Ser Xaa Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

- <210> 2
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Artificial sequence

- <220>
- <223> Monoclonal antibody

- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (21)..(21)
- <223> X is Leu or Ile

- <220>
- <221> MISC_FEATURE

PhoenixTemp27800.tmp.txt

<222> (29)..(29)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (33)..(33)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (46)..(47)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54)..(54)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (73)..(73)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (75)..(75)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (78)..(78)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (85)..(85)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (94)..(94)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (104)..(104)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (106)..(106)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (117)..(117)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (125)..(125)
<223> X is Leu or Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (136)..(136)
<223> X is Leu or Ile

<220>

PhoenixTemp27800.tmp.txt

<221> MISC_FEATURE
 <222> (144)..(144)
 <223> X is Leu or Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (150)..(150)
 <223> X is Leu or Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (160)..(160)
 <223> X is Leu or Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (179)..(179)
 <223> X is Leu or Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (181)..(181)
 <223> X is Leu or Ile

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (205)..(205)
 <223> X is Leu or Ile

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Xaa Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Xaa Tyr Ser Tyr
 20 25 30

Xaa Ala Trp His Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Xaa Xaa Val
 35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Xaa Ala Gly Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Ser Xaa Lys Xaa Lys Ser Xaa Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Xaa Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Xaa Phe Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Xaa Glu Xaa Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Xaa Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Xaa Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Xaa Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Xaa
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Xaa Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Xaa
 145 150 155 160

PhoenixTemp27800.tmp.txt

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Xaa Thr Xaa Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Xaa Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210



1) Une composition pharmaceutique pour l'administration parentérale en tant que vaccin comprenant un anticorps monoclonal et comme adjuvant un dérivé de l'aluminium à une concentration comprise entre 2,4 et 5,2 mg / ml de l'ion aluminium dans laquelle:

- Ledit anticorps monoclonal est l'anticorps monoclonal anti-idiotypique anti-ca-125 MEN 2234 comprenant SEQ. ID NO. 1 et SEQ ID NO. 2 et est présent à une quantité de 0,1 à 4 mg / ml, et
- Ledit composé aluminium est choisi parmi l'hydroxyde d'aluminium et de phosphate d'aluminium.

2) Une composition pharmaceutique selon la revendication 1 dans laquelle le dérivé de l'aluminium est à une concentration comprise entre 3,1 - 3,8 mg / ml de l'ion aluminium.

3) Une composition pharmaceutique selon la revendication 2, dans laquelle le composé aluminium est d'hydroxyde d'aluminium.

4) Une composition pharmaceutique selon la revendication 3 dans laquelle le MEN2234 est présent à une quantité de 0,2 - 2,5 mg / ml.

5) Une composition pharmaceutique selon la revendication 4, dans laquelle MEN2234 est présent à une quantité de 1,9 à 2,1 mg / ml.

6) Une composition pharmaceutique selon les revendications 1-5, dans laquelle MEN2234 est adsorbé sur le composé de l'aluminium et suspendu dans une solution saline tamponnée et isotonique.

7) Une composition pharmaceutique selon les revendications 1-6, sous forme d'une suspension liquide, pour l'administration parentérale.

8) Une composition pharmaceutique selon la revendication 7, pour administration sous-cutanée ou intramusculaire.

9) Une composition pharmaceutique selon les revendications 1 - 8, choisis parmi les suivants:

a) MEN2234 2.00 mg/ml, $\text{Al}(\text{OH})_3$ 10.00 mg/ml, KCl 0.20 mg/ml, KH_2PO_4 0.20 mg/ml, NaCl 8.00 mg/ml, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2.16 mg/ml, eau pour injections jusqu'à 1.00 ml

b) MEN2234 2.00 mg/ml, $\text{Al}(\text{OH})_3$ 7.50 mg/ml, KCl 0.20 mg/ml, KH_2PO_4 0.20 mg/ml, NaCl 8.00 mg/ml, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2.16 mg/ml, eau pour injections jusqu'à 1.00 ml

c) MEN2234 2.00 mg/ml, AlPO_4 10.00 mg/ml, KH_2PO_4 0.20 mg/ml, NaCl 9.00 mg/ml, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1.20 mg/ml, eau pour injections jusqu'à ad 1.00 ml

10) Une composition pharmaceutique selon les revendications 1-9 destinée à l'utilisation comme vaccin anti tumoral dans le traitement ou la prévention de tumeurs.

11) Une composition pharmaceutique selon la revendication 10, comme vaccin anti tumoral pour le traitement des tumeurs ovariennes.