

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 241**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2004 E 04818790 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 1687028**

54 Título: **Preparaciones de inmunoglobulina que tienen mayor estabilidad**

30 Prioridad:

**18.11.2003 EP 03026539**

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

**14.03.2013**

73 Titular/es:

**CSL BEHRING AG (100.0%)  
WANKDORFSTRASSE 10  
3014 BERN, CH**

72 Inventor/es:

**BOLLI, REINHARD;  
HODLER, GERHARD y  
STYGER, REGULA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 398 241 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

Preparaciones de inmunoglobulina que tienen mayor estabilidad

5 La presente invención se refiere a una preparación de inmunoglobulina con mayor estabilidad, que contiene prolina como estabilizante y tiene un pH de 4.2 a 5.4. La invención se refiere además a una composición farmacéutica y a un método de estabilización de preparaciones de inmunoglobulina.

10 Las preparaciones de proteínas, en particular las preparaciones de inmunoglobulina para inyección intravenosa, se han utilizado desde hace bastante tiempo. Las proteínas, y la inmunoglobulina en particular, tienden a formar agregados y/o dímeros y a fragmentarse o desnaturalizarse. Si dichas soluciones se inyectan por vía intravenosa, los agregados pueden provocar reacciones secundarias graves inclusive shock anafiláctico. Con el fin de evitar la agregación, la fragmentación, etc. en dichas soluciones de proteínas, y para mejorar su estabilidad, se han intentado una serie de tratamientos en el estado actual de la tecnología. Por ejemplo, para mejorar la estabilidad en el  
 15 almacenamiento, a menudo las preparaciones de IgG intravenosa para uso clínico se liofilizan (liofilización), pero dichas preparaciones se deben reconstituir con un diluyente antes de usar. El paso de reconstitución es incómodo y consume mucho tiempo, y aumenta la probabilidad de contaminación del producto. Otra manera, bien conocida en el área, de mejorar la estabilidad y el almacenamiento de la inmunoglobulina, es la adición de excipientes estabilizantes de la proteína a la preparación de IgG. Los excipientes conocidos incluyen azúcares, polioles, aminoácidos, aminos, sales, polímeros y tensioactivos. En el área existen abundantes ejemplos de estrategias de estabilización de los productos farmacéuticos de proteínas. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 4,499,073 (Tenold) mejora la estabilización a través de la selección del pH y la fuerza iónica. JP 54020124 da a conocer la adición de un aminoácido a una preparación intramuscular para hacer que el almacenamiento sea estable y seguro. JP 57031623 y JP 57128635 dan a conocer el uso de arginina y/o lisina con NaCl en preparaciones de IgG de 5 a  
 20 15% para lograr la estabilidad a largo plazo en una preparación intramuscular. JP 56127321 da a conocer la adición a IgG de un alcohol de azúcar que funciona mejor que la glucosa utilizada en el pasado para suprimir la agregación. JP 4346934 da a conocer el uso de baja conductividad (menos de 1 mmho), pH 5.3 a 5.7 y opcionalmente uno o más estabilizantes como PEG, albúmina sérica humana y manitol. US 4,439,421 (Hooper) instruye acerca de la adición de una macromolécula hidrófila, un poliol y otra proteína para lograr estabilidad ante la generación de ACA (actividad anti-complemento). US 5,945,098 (Samo) da a conocer la estabilización de soluciones isotónicas por adición de aminoácidos (glicina 0.1 a 0.3 M) y detergentes no iónicos (polisorbato) y PEG. US 4,186,192 (Lundblad) da a conocer diversos aditivos, incluidos aminoácidos, sin especificar, sin embargo, el uso de aminoácidos individuales específicos. Esta divulgación incluye la estabilización de IgG con maltosa y además glicina hasta 0.1 M. US 4,362,661 (Ono) da a conocer el uso de aminoácidos neutros y básicos para impartir estabilidad a un producto de IgG al 5%. Todos los documentos mencionados antes dan a conocer preparaciones de IgG de un pH ácido pero  
 35 todavía relativamente alto, superior a 5.2.

Además de prevenir la formación de agregados de inmunoglobulina, también se ha reconocido que la formación de dímeros, en particular de IgG, puede ser perjudicial para las preparaciones de IgG para administración por vía  
 40 intravenosa. Aunque los dímeros de IgG no son conocidos por causar shock anafiláctico, sin embargo se encontró que preparaciones de IgG con un contenido de dímero elevado, no son tan bien toleradas en inyección intravenosa y pueden provocar efectos secundarios indeseados, como fiebre, náuseas y a veces hipotensión arterial. Los efectos hipotensores fueron detectados en un modelo de ratas por Bleaker et al (Vox Sanguinis 52, 281-290, 1987), y esto también muestra una correlación aparente con el contenido de dímero. La formación de dímeros no llega a ser un problema cuando la preparación de IgG se liofiliza poco después de que se produce. Sin embargo, si la preparación está destinada al almacenamiento en forma líquida no liofilizada, la concentración de dímero aumenta con el tiempo de almacenamiento.

La patente de los Estados Unidos N° 5,871,736 (Bruegger et al.) da a conocer preparaciones de inmunoglobulina, particularmente preparaciones líquidas de IgG para infusión intravenosa que contienen uno o más estabilizantes anfífilicos para lograr estabilidad ante la formación de dímeros. Los estabilizantes anfífilicos incluyen el ácido nicotínico y sus derivados, en particular nicotinamida y, principalmente, en conjunción con los anteriores, aminoácidos que tienen cadenas laterales lipófilas sin carga, por ejemplo, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina, prolina y valina. La divulgación experimental de este documento del estado anterior de la técnica da a conocer  
 50 aminoácidos siempre en conjunto con nicotinamida, y las concentraciones dadas a conocer para los aminoácidos son 200 mmol/l para prolina, 80 mmol/l para glicina y 120 mmol/litro para isoleucina.

El rango de pH para las preparaciones dadas a conocer en US 5,871,736 se establece en general como entre 4 y 8, pero la divulgación real de los ejemplos indica un pH de 5.3.

60 Aunque la patente de los Estados Unidos recién mencionada da a conocer preparaciones de IgG en las cuales la formación de dímero ha sido suprimida en cierta medida, sigue siendo deseable proporcionar preparaciones de proteínas, en particular, preparaciones de inmunoglobulina, que presenten una mayor estabilización, en particular a temperatura ambiente.

Los inventores encontraron que se puede lograr un grado de estabilización asombrosamente alto de las preparaciones de proteína líquidas, ajustando el pH de la preparación final a un valor entre 4.2 y 5.4 y agregando como estabilizante, un aminoácido básico o no polar.

5 Por lo tanto, la presente invención proporciona una preparación de inmunoglobulina con una mayor estabilidad, donde la preparación contiene prolina como estabilizante que no se utiliza en combinación con nicotinamida y donde la preparación tiene un pH de 4.2 a 5.4. Cuando se utiliza prolina como estabilizante, preferentemente es L-prolina. También es posible utilizar equivalentes de prolina, por ejemplo, análogos de prolina.

10 Sorprendentemente, se encontró que la adición de prolina por sí sola, sin otros estabilizantes (como nicotinamida) y el ajuste del pH de la preparación final aumentan notablemente la estabilidad de esas preparaciones, particularmente a temperatura ambiente. La mayor estabilidad es demostrada por la mejor estabilidad de las preparaciones a temperaturas entre alrededor de 2 °C y alrededor de 40 °C, especialmente a temperatura ambiente que preferentemente varía entre aproximadamente 10 °C, más preferentemente aproximadamente 15 °C, aún más preferentemente aproximadamente 20 °C y aproximadamente 30 °C, más preferentemente 25 °C. La mayor estabilidad de las preparaciones de la invención también es visible a temperaturas superiores entre alrededor de 30 °C y alrededor de 40 °C, incluida la temperatura corporal de aproximadamente 37 °C. Preferentemente, la mayor estabilidad se define además, alternativa o adicionalmente, como mayor tiempo de almacenamiento, menor fragmentación, menor formación de agregados, menor formación de dímeros y/o menor decoloración. Mayor tiempo de almacenamiento significa que las preparaciones de la invención son preferentemente estables durante al menos 30 días, preferentemente al menos 60 días, más preferentemente al menos 90 días, aún más preferentemente al menos 120 días, muy preferentemente durante aún más tiempo.

25 Menor agregación significa preferentemente que las preparaciones muestran un menor porcentaje de agregados (en particular en el caso de Ig) que las preparaciones convencionales. Preferentemente, el contenido de dímero de las preparaciones es inferior a aproximadamente 12%, preferentemente inferior a aproximadamente 10%, más preferentemente inferior a aproximadamente 8%. Menor coloración significa preferentemente que la densidad óptica de las formulaciones de la invención es entre aproximadamente 20% y 60% menor que la de las formulaciones convencionales.

30 En general, las preparaciones de inmunoglobulina de la presente invención son formulaciones líquidas que son útiles para inyección intravenosa. Dichas preparaciones se pueden almacenar y son estables en forma líquida y por lo tanto no requieren liofilización ni otro tratamiento y pueden ser utilizados fácilmente.

35 Preferentemente, la preparación de inmunoglobulina es una preparación de anticuerpos en la cual los anticuerpos pueden ser de cualquier idiotipo pero preferentemente IgG, IgA o IgM. Las preparaciones de IgG son particularmente preferidas. Las inmunoglobulinas pueden ser policlonales o monoclonales y se pueden aislar de la sangre humana o animal o producir por otros medios, por ejemplo mediante tecnología de recombinación del ADN o tecnología del hibridoma. En general, las inmunoglobulinas se obtienen del plasma sanguíneo por fraccionamiento con alcohol, que se puede combinar con otras técnicas de purificación como cromatografía, adsorción o precipitación. Las inmunoglobulinas se pueden tratar con trazas de enzimas (por ejemplo, pepsina) con el fin de reducir la actividad anticomplementaria o se pueden utilizar enteras.

45 Las preparaciones se pueden obtener por métodos conocidos en el área, excepto que el pH de la preparación final se ajusta a un pH relativamente alto pero ácido, es decir, en el rango de aproximadamente pH 4.2 a 5.4. Se encontró que este rango de pH es particularmente útil para mejorar el almacenamiento de las características de las preparaciones de inmunoglobulina. El rango de pH es preferentemente de 4.5 a aproximadamente 5.2, prefiriéndose particularmente un rango de pH de aproximadamente 4.6 a 5.0, y especialmente el pH 4.8.

50 En el curso del desarrollo de las preparaciones de acuerdo con la presente invención, también se encontró que aumentar la concentración final del estabilizante permite una sorprendente mejora en las características de almacenamiento y en la estabilidad de las preparaciones. Por lo tanto, el estabilizante se agrega a una concentración final de al menos 0.2 M. Preferentemente, la concentración final es entre 0.2 y 0.4 M, más preferentemente entre 0.2 y 0.3 M, y muy preferentemente de 0.25 M.

55 La presente invención es particularmente útil para las preparaciones de inmunoglobulina con una concentración relativamente alta de proteína. La preparación final de la presente invención tiene una concentración de proteína de aproximadamente 5 a 25% p/v, preferentemente de aproximadamente 6 a 15% p/v, más preferentemente de aproximadamente 8 a 12% p/v, muy preferentemente de aproximadamente 10% p/v. La concentración de proteína final dependerá de diversos factores, como la vía de administración, el tipo de enfermedad que se va a tratar, etc. Los expertos podrán determinar la concentración de proteína óptima para la aplicación prevista. Por ejemplo, para infusión intravenosa, la preparación final de la invención tiene preferentemente una concentración de proteína de aproximadamente 15 a 20% p/v, preferentemente de aproximadamente 8 a 12% p/v. En el caso de IgG para uso

intravenoso, es particularmente útil 10% p/v, es decir, 100 g de IgG/litro. Para la administración subcutánea se puede elegir una dosis mayor, por ejemplo de aproximadamente 15 a 20% p/v.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la preparación de inmunoglobulina de la presente invención así como aditivos farmacéuticamente aceptables. Dichos aditivos pueden ser excipientes, diluyentes como agua, y otras sustancias como sustancias no amortiguadoras, por ejemplo, cloruro de sodio, glicina, sacarosa, maltosa y sorbitol. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden administrar por diferentes vías. Para administración intravenosa, se puede utilizar una dosis de aproximadamente 0.2 g, preferentemente de aproximadamente 0.5 g a 2.0 g de inmunoglobulina/kilogramo de peso corporal, al día.

Otro aspecto de la presente invención es un método de estabilización de las preparaciones de inmunoglobulina, que consiste en proporcionar una solución acuosa de proteína y agregarle prolina como estabilizante, donde el pH de la solución se ajusta a un valor de pH de aproximadamente 4.2 a 5.4. El pH se ajusta preferentemente a un valor dentro de los rangos preferidos indicados antes, prefiriéndose particularmente el pH 4.8. El método comprende, preferentemente, ajustar las concentraciones de proteína y las concentraciones de estabilizante.

En particular, el método comprende los pasos de proporcionar una solución acuosa de inmunoglobulina con una concentración de proteína de aproximadamente 5 a 25% p/v, ajustar el pH de la solución entre 4.2 y 5.4, y agregar prolina como estabilizante a la solución para lograr una concentración final de estabilizante de 0.2 a 0.4 M a fin de obtener una preparación de inmunoglobulina estable. Se conocen varios procesos para aislar inmunoglobulinas del plasma humano o de sus fracciones. Las inmunoglobulinas se pueden purificar por ejemplo por fraccionamiento con etanol frío y/o fraccionamiento con ácido octanoico y/o procedimientos cromatográficos. Los métodos de purificación que se prefieren particularmente para los fines de la presente invención incluyen el fraccionamiento con etanol, seguido de fraccionamiento con ácido octanoico, seguido de tratamiento a pH bajo, cromatografía y nanofiltración. Al producir inmunoglobulinas para aplicaciones intravenosas como las de la presente invención, se debe tener especial cuidado de reducir o eliminar los complejos inmunológicos con actividad anti-complemento y proteasas como calicreína o plasminógeno. La inmunoglobulina que se va utilizar en las preparaciones de proteína de la presente invención se lleva a la concentración deseada entre aproximadamente 5 y 25% p/v por métodos conocidos, por ejemplo por ultrafiltración. El pH de la preparación de inmunoglobulina líquida se ajusta a un pH de 4.2 a 5.4, y el estabilizante prolina se agrega a la solución a una concentración final de al menos aproximadamente 0.2 M. Preferentemente la prolina se agrega a una concentración de aproximadamente 0.2 M a 0.4 M, preferentemente de aproximadamente 0.25 M.

La presente invención se ilustrará ahora por medio de los ejemplos y las figuras siguientes.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el contenido de agregados determinado por HPLC para una solución de IgG al 8% que contiene prolina 0.25 M o glicina 0.25 M.

La figura 2 muestra el contenido de dímeros determinado por HPLC para una solución de IgG al 8% que contiene prolina 0.25 M o glicina 0.25 M.

La figura 3 muestra el contenido de fragmentos determinado por SDS PAGE de soluciones de IgG al 8% que contienen prolina 0.25 M o glicina 0.25 M.

La figura 4 muestra la densidad óptica (UV 350-500 nm) de dos soluciones de IgG que contienen prolina 0.25 M o glicina 0.25 M.

## Ejemplos

Ejemplo 1 Fabricación de una preparación de proteína de acuerdo con la invención.

El material de partida para el proceso de fabricación de Ig intravenosa es un intermediario con licencia del proceso de fraccionamiento con etanol de Kistler Nitschmann. Se trata de una precipitación de la fracción de inmunoglobulina del plasma utilizando etanol al 19% a pH 5.8

Las proteínas de alto peso molecular, los complejos de lipoproteínas y otros contaminantes se precipitaron usando ácido octanoico y después se separaron por filtración en presencia de un auxiliar de filtración. Después se concentró sobrenadante antes de someterlo a un paso de incubación a pH bajo.

Luego el pH se ajustó a pH 6.5 y el material se clarificó adicionalmente por filtración para separar las IgA e IgM precipitadas. Después la solución enriquecida en IgG se purificó finalmente en una resina de intercambio aniónico, de acuerdo con U.S. 6,093,324, excepto que la carga fue de 150 gramos por litro de resina.

La eliminación viral se logró utilizando un nanofiltro.

5 Formulación: el nanofiltrado se concentró hasta 3% de proteína y se diafiltró contra 5 volúmenes de agua, seguido de concentración de la IgG hasta 120 g por litro. Finalmente, el concentrado se estabilizó con L-prolina 250 mM, se diluyó a 100 g de IgG por litro y el pH se mantuvo en 4.8. El granel formulado se filtró a través de un filtro de membrana de 0.2 µm.

Ejemplo 2 Análisis de las preparaciones de IgG de acuerdo con la invención.

10 El concentrado de IgG, purificado del plasma mediante una combinación de pasos de precipitación y cromatografía y el virus inactivado de acuerdo con el ejemplo 1 se fraccionó en tres porciones con 260 ml formulados a pH 4.5, 420 ml formulados a pH 4.8 y 260 ml formulados a pH 5.1. Después las formulaciones se dividieron, una mitad se formuló con glicina 0.25 M y la otra con prolina 0.25 M. La concentración final de proteína fue de 8% p/v. Se distribuyeron alícuotas de 10 ml en viales de vidrio tipo I de 10 ml (tapones de goma tipo I).

15 Las alícuotas se almacenaron a tres temperaturas diferentes, 2 a 8 °C, 26 °C y 45 °C. Las muestras entre 2 y 8 °C se almacenaron en presencia de luz (Phillips TLD 18W/33). Las muestras se incubaron a 26 °C o a 45 °C durante al menos dos meses en la oscuridad. Los resultados se muestran en las figuras 1 a 4.

20 Agregados

Los niveles de agregados para la IgG formulada con glicina fueron superiores a los de la IgG formulada con prolina en todas las condiciones analizadas.

25 Se promovió una formación significativa de agregados mediante la incubación a 45 °C. Ésta fue similar tanto para las formulaciones de prolina como de glicina. El pH bajo promovió la formación de agregados a 45 °C, donde las formulaciones de pH 4.5 que contenían 12.2% (prolina) y 16.7% (glicina) se agregaron a los 90 días. En contraposición, las formulaciones de pH 5.1 que contenían 6.3% (prolina) y 8.3% (glicina) se agregaron a los 90 días.

30 Dímeros

35 Los niveles de dímeros fueron influenciados por el pH, la temperatura y el tipo de excipiente. El pH demostró ser el factor más importante, observándose mayores niveles de dímeros a medida que aumentaba el pH de la formulación. Esto se observó tanto para las formulaciones de glicina como de prolina. Los resultados indican que las formulaciones que contienen prolina son capaces de mantener los niveles de dímero más bajos que las formulaciones de glicina equiparables. La temperatura de incubación modula el equilibrio monómero/dímero, favoreciendo las temperaturas menores la formación de dímeros.

40 Monómeros y dímeros

45 El contenido combinado de monómero/dímero para todas las formulaciones a 2-8 °C y a 26 °C permaneció superior al 90%. Se observaron niveles menores en soluciones de IgG formuladas con glicina debido al mayor contenido de agregados. La incubación a 45 °C dio lugar a tres formulaciones que tenían niveles inferiores a 90% después de 60 días (85.1% de glicina, pH 4.5, 89.1% de prolina, pH 4.5 y 89.1% de glicina, pH 4.8). Nuevamente, esos resultados resaltan la mayor capacidad de la prolina con respecto a la glicina para conservar la integridad molecular de las moléculas de IgG.

50 Fragmentos de IgG

55 Los resultados indican que las formulaciones de glicina contienen niveles de fragmentos ligeramente inferiores en comparación con las de prolina. La temperatura de incubación y el pH demostraron ser los factores más importantes que influyen sobre la fragmentación de IgG. A 45 °C los niveles de fragmentos para las formulaciones de prolina variaron de 5.2% (pH 5.1) a 5.8% (pH 4.5), mientras que en las formulaciones de glicina variaron de 4.3% (pH 5.1) a 4.8% (pH 4.8). A pH elevado (4.8 a 5.1) hubo menos fragmentación.

Aspecto de la solución

60 Se investigaron cuatro parámetros principales: claridad, turbidez, partículas y coloración visible. Los parámetros con aspecto, claridad y turbidez fueron satisfactorios. La coloración (amarillo/marrón) de las soluciones se produjo durante el período de incubación y se relacionó tanto con la temperatura de incubación como con la exposición a la luz. La coloración de las formulaciones de IgG se controló usando la prueba de densidad óptica (UV 350-500 nm). El aumento del color se asoció con la exposición a la luz y con mayores temperaturas de incubación. Las formulaciones de glicina presentaron densidades ópticas que fueron entre 25% y 48% superiores a las de las formulaciones de

prolina correspondientes. Estos resultados proporcionan prueba adicional de que la prolina es un mejor estabilizante que la glicina en soluciones de IgG. A pH elevado (4.8 a 5.1) hubo menos coloración que a un pH inferior (4.5).

Ejemplo 3 Estabilidad de las preparaciones de IgG de acuerdo con la invención (dependencia del pH).

5 El concentrado de IgG, purificado del plasma mediante una combinación de pasos de precipitación y cromatografía y el virus inactivado según el ejemplo 1 se fraccionó en dos porciones y se formuló con o sin 400 mmol/L de L-prolina a pH 4.2, 4.8, 5.3 y 6.8. La concentración final de proteína fue de 12% p/v. Se distribuyeron alícuotas de 10 ml en viales de vidrio y se incubaron a 40 °C durante al menos 3 meses en la oscuridad. Al inicio (tiempo 0) y después de 10 90 días de incubación, las muestras se analizaron por HPLC para determinar la presencia de agregados, IgG dimérica y monomérica, mediante fotometría para absorbancia a 350 - 500 nm, mediante SDS PAGE (fragmentos) y anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (anti-HBs). Los resultados presentados en la tabla 1 muestran que la mejor estabilidad de la solución de IgG se obtiene a un pH ácido moderado de 4.8 a 5.3.

Tabla 1: Dependencia del pH de la estabilidad de una preparación de proteína (10%) de acuerdo con la invención

Aditivo	Ninguno							
	4.2		4.8		5.3		6.8	
pH								
Tiempo de incubación (días)	0	90	0	90	0	90	0	90
Agregado (%)	3.5	40.2	1.16	5	1.31	3.1	3.22	2.7
Dímero (%)	6.5	3.6	10.6	11.1	12.2	13.8	16.4	19.0
Fragmentos	1.4	2.6	1.3	3.5	1.3	3.6	1.5	3.4
Absorbancia (350 a 500 nm)	0.107	0.159	0.125	0.186	0.156	0.205	0.355	0.936
anti-HBs (IU/ml)	7.0	2.6	6.5	3.5	6.3	3.5	6.3	3.5
Aditivo	L-Prolina (400 mMol/L)							
	4.2		4.8		5.3		6.8	
pH								
Tiempo de incubación (días)	0	90	0	90	0	90	0	90
Agregado (%)	1.97	26.4	0.82	4.5	0.85	2.5	1.78	2.9
Dímero (%)	4.3	4	6.4	6.2	7.8	9.5	11.8	13.9
Fragmentos (%)	1.4	2.9	1.3	3.5	1.3	4.0	1.5	3.6
Absorbancia (350 a 500 nm)	0.202	0.234	0.134	0.213	0.125	0.235	0.249	0.55
anti-HBs (IU/ml)	7.0	2.9	6.5	3.5	6.3	4.0	6.3	3.6

Ejemplo 4 Estabilidad de las preparaciones de IgG de acuerdo con la invención formuladas con diferentes aditivos

20 Los concentrados de IgG, purificados del plasma mediante una combinación de pasos de precipitación y cromatografía y el virus inactivado según el ejemplo 1 se formularon con aditivos de diferentes clases de sustancias (azúcares y alcoholes de azúcar, aminoácidos y detergentes) a pH 4.2, 4.8, 5.3 y 6.8. La concentración final de proteína fue de 10% p/v. Se distribuyeron alícuotas de 10 ml en viales de vidrio y se incubaron a 37 °C o 40 °C 25 durante al menos 3 meses en la oscuridad. Después de 90 días de incubación la muestra se analizaron por HPLC para determinar agregados, IgG dimérica, monomérica, y fragmentos, mediante fotometría por absorbancia a 350 - 500 nm y mediante ELISA para determinar anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (anti-HBs).

30 Los resultados presentados en la tabla 2 muestran que la mejor estabilidad de la solución de IgG se obtiene a un pH ácido moderado de 4.8 o 5.3 con las formulaciones más favorables que tienen L-prolina.

Tabla 2: Estabilidad de una preparación de proteína (10%) de acuerdo con la invención, formulada con diferentes aditivos y a diferente pH.

pH 4.2				
Temp. de incub.	Aditivo	Absorbancia	HPLC	anti-HBs

ES 2 398 241 T3

		350-500 nm	Agregados	Dímeros	Monómeros	Fragmentos	
			%	%	%	%	IU/mL
37 °C	D(-)Manitol (10%)	0.134	3.00	4.19	87.37	5.44	1.63
	Sacarosa (10%)	0.271	3.18	3.38	87.87	5.57	1.59
	Maltosa (10%)	0.422	5.30	3.83	85.54	5.33	1.42
	Glicina (250 mmol/L)	0.177	5.82	3.75	84.64	5.79	1.57
	L-Prolina (250 mmol/L)	0.166	5.50	2.98	85.87	5.64	1.70
	Polisorbato 80 (0.02%)	0.166	7.03	3.54	83.94	5.49	1.53
	Ninguno	0.172	7.83	3.67	83.11	5.39	1.52
40 °C	Glicina (400 mmol/L)	0.251	22.06	5.27	68.59	4.08	2.44
	L-Prolina (400 mmol/L)	0.231	26.38	3.96	65.77	3.89	2.87
	L-Isoleucina (200 mmol/L)	0.257	52.03	2.59	41.25	4.13	1.74
	L-Metionina (200 mmol/L)	0.175	37.66	3.32	55.41	3.61	2.44
	L-Valina (250 mmol/L)	0.197	29.30	4.40	62.67	3.63	2.66
pH 4.8							
Temp. de incub.	Aditivo	Absorbancia	HPLC				anti-HBs
		350-500 nm	Agregados	Dímeros	Monómeros	Fragmentos	
			%	%	%	%	IU/mL
37 °C	D(-)Manitol (10%)	0.147	3.45	7.08	86.84	2.62	1.93
	Sacarosa (10%)	0.195	0.73	6.07	90.24	2.96	1.66
	Maltosa (10%)	0.489	0.97	7.66	88.41	2.96	1.73
	Glicina (250 mmol/L)	0.242	1.37	7.05	88.64	2.94	1.94
	L-Prolina (250 mmol/L)	0.183	0.99	4.90	91.17	2.94	2.25
	Polisorbato 80 (0.02%)	0.166	1.25	7.14	88.75	2.86	1.94
	Ninguno	0.165	1.29	7.54	88.30	2.87	1.94
40 °C	Glicina (400 mmol/L)	0.241	3.79	10.42	83.47	2.32	3.77

ES 2 398 241 T3

pH 4.8							
Temp. de incub.	Aditivo	Absorbancia	HPLC				anti-HBs
			350-500 nm	Agregados	Dímeros	Monómeros	
			%	%	%	%	IU/mL
	L-Prolina (400 mmol/L)	0.213	4.47	7.09	85.96	2.48	3.54
	L-Isoleucina (200 mmol/L)	0.488	4.88	9.67	83.27	2.18	3.87
	L-Metionina (200 mmol/L)	0.174	5.93	7.46	84.08	2.53	3.83
	L-Valina (250 mmol/L)	0.207	6.46	9.58	81.53	2.41	3.71
pH 5.3							
Temp. de incub.	Aditivo	Absorbancia	HPLC				anti-HBs
			350-500 nm	Agregados	Dímeros	Monómeros	
			%	%	%	%	IU/mL
37 °C	D(-)Manitol (10%)	0.179	1.39	10.49	85.62	2.50	1.84
	Sacarosa (10%)	0.185	0.61	8.46	88.36	2.57	1.88
	Maltosa (10%)	0.516	0.76	11.04	85.51	2.69	1.70
	Glicina (250 mmol/L)	0.263	0.98	9.09	87.59	2.34	1.92
	L-Prolina (250 mmol/L)	0.195	0.78	7.34	89.58	2.30	2.20
	Polisorbato 80 (0.02%)	0.196	0.94	9.56	86.94	2.56	1.91
	Ninguno	0.177	0.93	10.13	86.40	2.53	1.90
40 °C	Glicina (400 mmol/L)	0.336	2.82	12.75	82.43	2.00	3.92
	L-Prolina (400 mmol/L)	0.235	2.49	9.54	85.90	2.07	4.02
	L-Isoleucina (200 mmol/L)	0.275	4.14	11.06	82.76	2.04	3.73
	L-Metionina (200 mmol/L)	0.207	3.21	9.67	84.42	2.71	3.58
	L-Valina (250 mmol/L)	0.253	4.26	12.00	81.30	2.44	3.93
pH 6.8							
Temp. de incub.	Aditivo	Absorbancia	HPLC				anti-HBs
			350-500 nm	Agregados	Dímeros	Monómeros	
			%	%	%	%	IU/mL



ES 2 398 241 T3

		350-500 nm	Agregados	Dímeros	Monómeros	Fragmentos	
			%	%	%	%	IU/mL
37 °C	D(-)Manitol (10%)	0.300	4.94	12.14	80.25	2.67	1.61
	Sacarosa (10%)	0.270	0.95	12.19	84.16	2.70	1.89
	Maltosa (10%)	1.008	5.96	16.81	74.46	2.77	1.34
	Glicina (250 mmol/L)	0.807	1.19	12.34	84.39	2.08	1.87
	L-Prolina (250 mmol/L)	0.328	1.10	10.89	85.87	2.14	1.90
	Polisorbato 80 (0.02%)	0.308	1.50	13.85	81.74	2.92	1.60
	Ninguno	0.344	1.40	13.68	81.91	3.00	1.73
40 °C	Glicina (400 mmol/L)	1.063	3.00	16.61	78.08	2.32	3.72
	L-Prolina (400 mmol/L)	0.550	2.89	13.95	80.69	2.47	3.61
	L-Isoleucina (200 mmol/L)	0.840	4.47	15.38	77.77	2.38	3.87
	L-Metionina (200 mmol/L)	0.687	2.96	13.68	79.79	3.57	3.66
	L-Valina (250 mmol/L)	1.083	4.62	15.16	75.33	4.89	3.13

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una preparación de inmunoglobulina estable, donde la preparación contiene prolina y tiene un pH de 4.2 a 5.4 y donde la preparación no contiene nicotinamida.
2. La preparación de la reivindicación 1, que contiene prolina a una concentración final de al menos 0.2 M.
- 10 3. Una preparación de inmunoglobulina estable, donde la preparación contiene prolina y tiene un pH de 4.2 a 5.4 y donde la concentración final de prolina es entre 0.2 y 0.4 M.
4. La preparación de la reivindicación 1 a 3, donde la prolina es L-prolina.
5. La preparación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene un pH de 4.5 a 5.2.
- 15 6. La preparación de la reivindicación 5, que tiene un pH de 4.6 a 5.0.
7. La preparación de la reivindicación 6, que contiene prolina a una concentración final de 0.25 M.
- 20 8. La preparación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde su concentración de inmunoglobulina es entre 5 y 25% p/v.
9. La preparación de la reivindicación 8, donde su concentración de inmunoglobulina es entre 15 y 20% p/v, para administración subcutánea.
- 25 10. La preparación de la reivindicación 8, donde su concentración de inmunoglobulina es entre 6 y 15% p/v, para administración intravenosa.
11. La preparación de la reivindicación 10, donde su concentración de inmunoglobulina es entre 8 y 12% p/v.
- 30 12. La preparación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la preparación es una preparación de IgG, IgA o IgM.
- 35 13. Una composición farmacéutica que comprende la preparación de inmunoglobulina de una de las reivindicaciones precedentes y aditivos farmacéuticamente aceptables.
- 40 14. Un método de estabilización de las preparaciones de inmunoglobulina, que comprende proporcionar una solución acuosa de inmunoglobulina y agregarle prolina, donde el pH de la solución se ajusta a un pH de aproximadamente 4.2 a 5.4 y donde la prolina no se usa en combinación con nicotinamida.
15. El método de la reivindicación 14, donde el pH se ajusta a 4.8.
- 45 16. El método de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, donde la concentración de prolina se ajusta entre 0.2 y 0.4 M.

Figuras

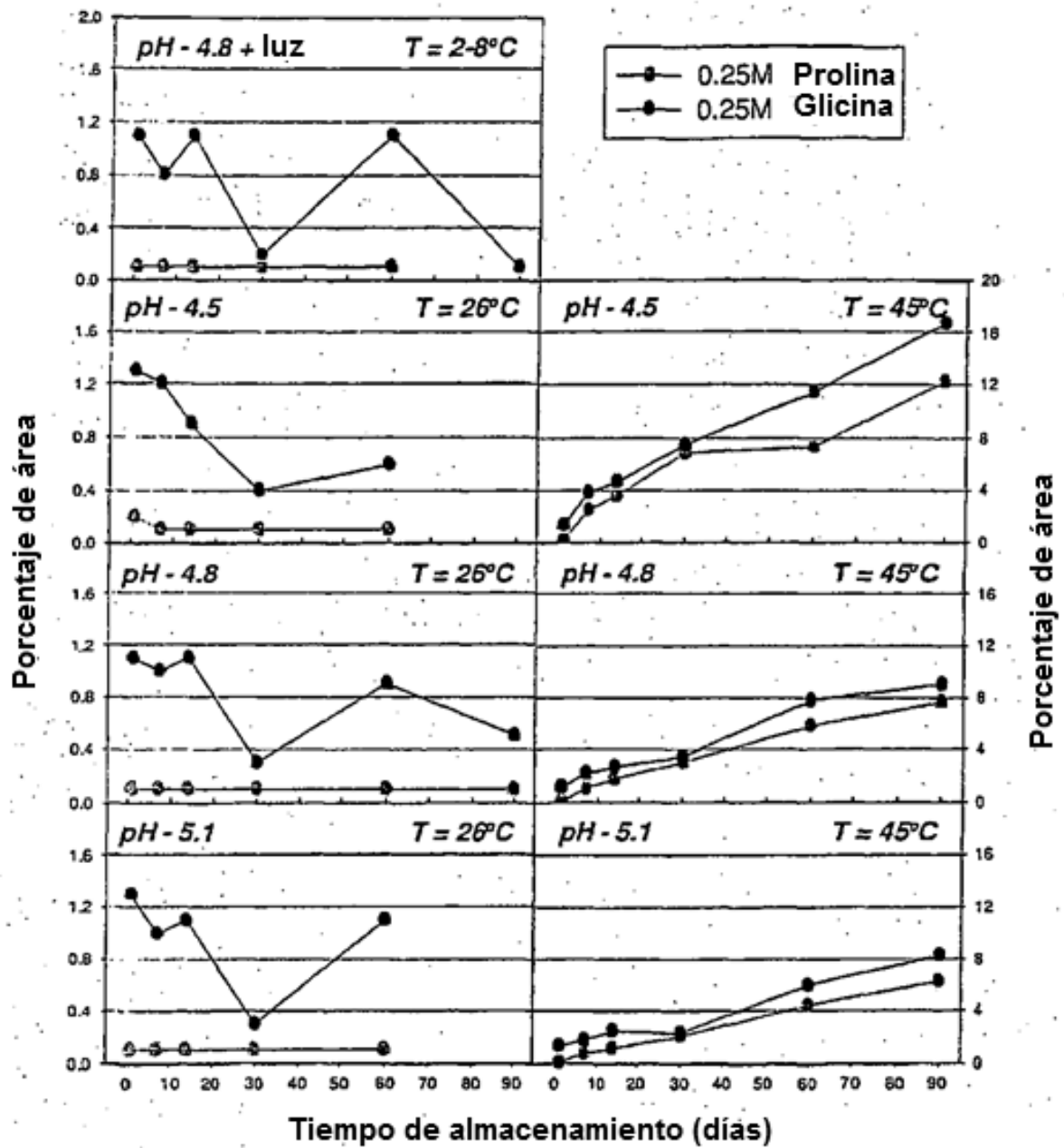


Figura 1

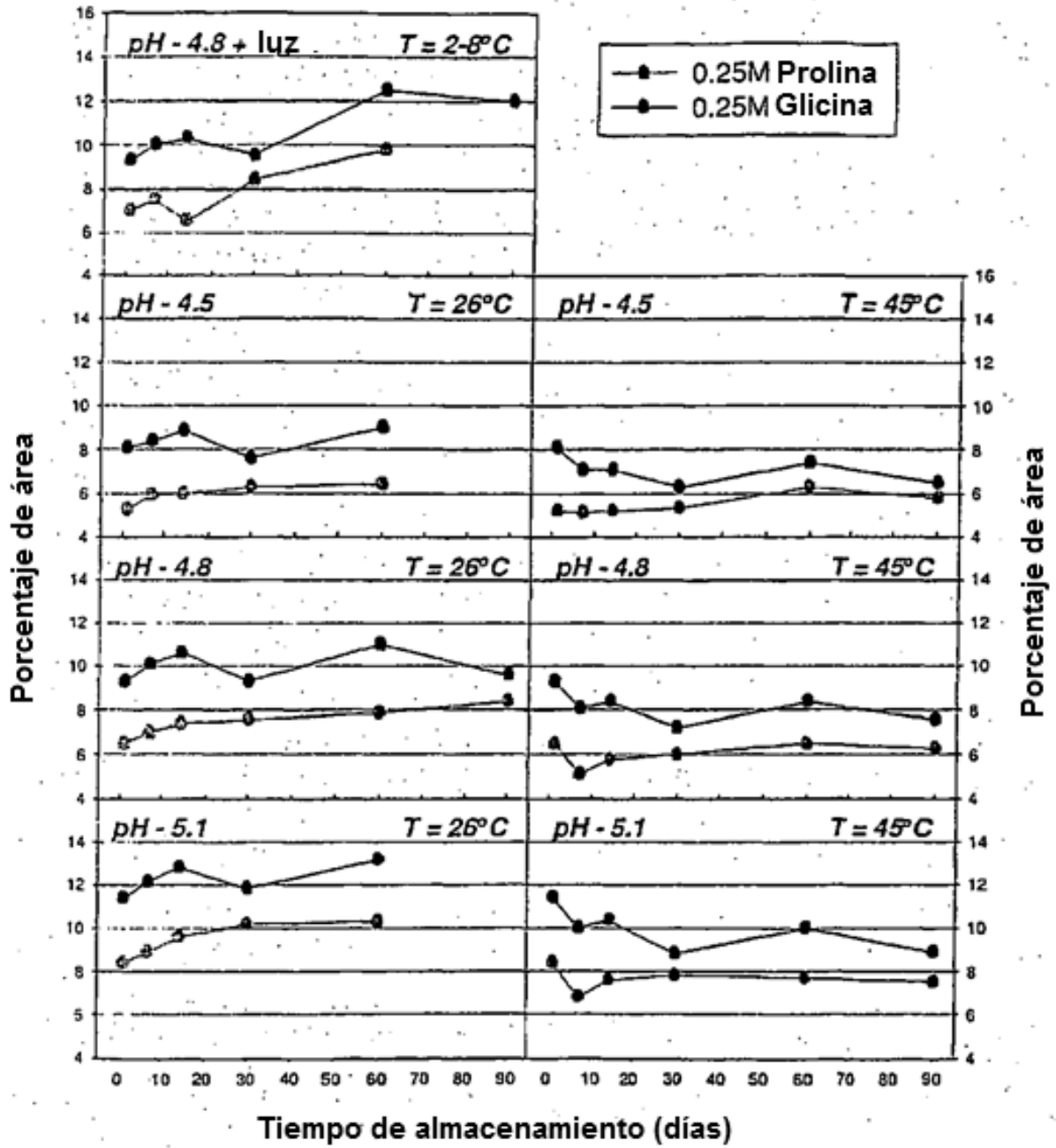


Figura 2

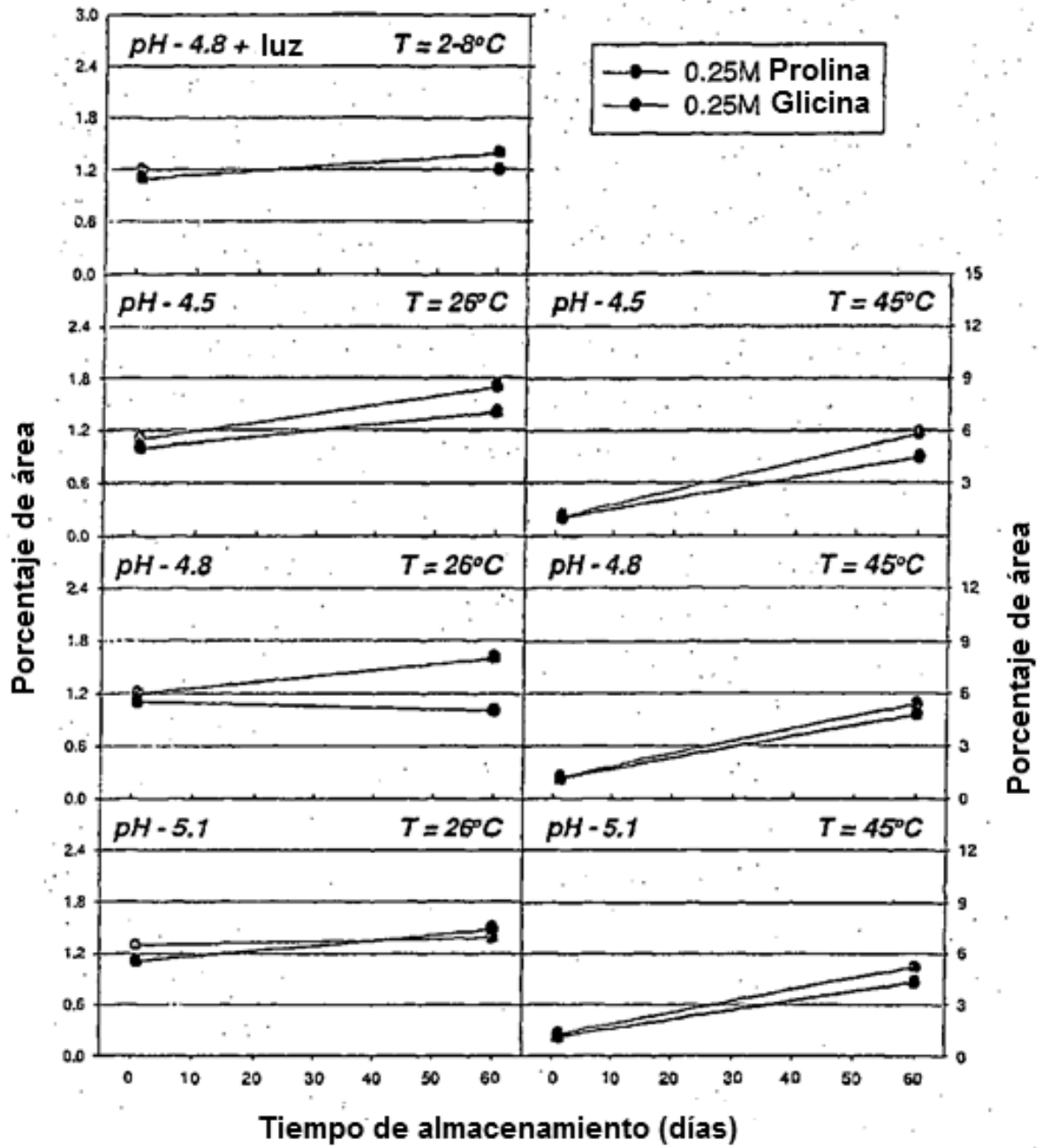


Figura 3

0.0.1

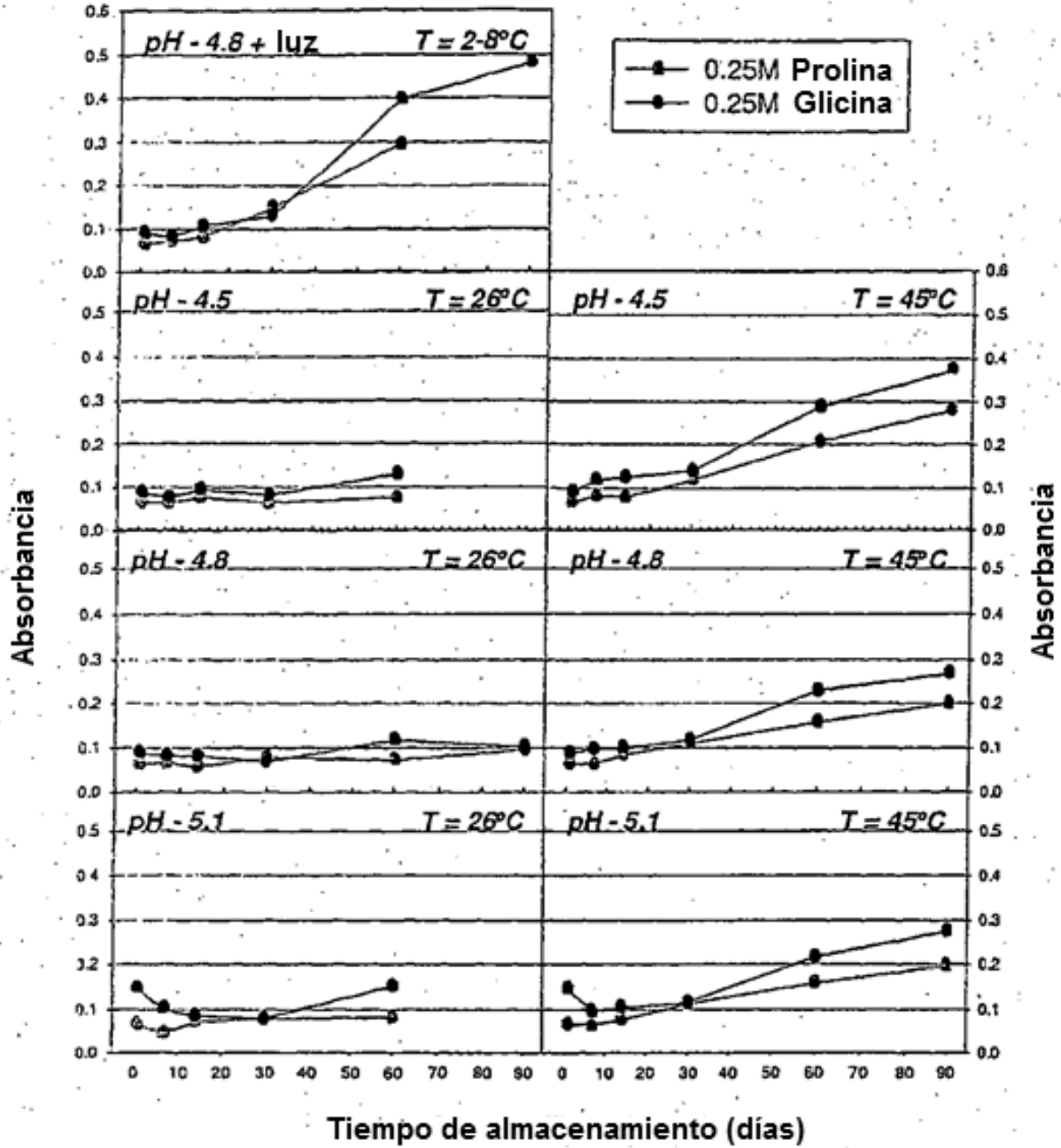


Figura 4