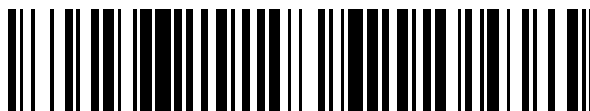


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 736**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/06** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.1999 E 10184829 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2272870**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de inmunoglobulinas para administración intravenosa y otros productos inmunoglobulínicos**

30 Prioridad:

**28.09.1998 US 102055 P**  
**09.06.1998 EP 98201909**

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

**05.09.2013**

73 Titular/es:

**CSL BEHRING AG (100.0%)**  
**Wankdorfstrasse 10**  
**3000 Bern 22, CH**

72 Inventor/es:

**LAURSEN, INGA y**  
**TEISNER, BØRGE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 421 736 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para la preparación de inmunoglobulinas para administración intravenosa y otros productos inmunoglobulínicos

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar inmunoglobulinas, es decir, inmunoglobulina G (IgG), a partir de plasma crudo o de una fracción proteica de plasma crudo. La invención también se refiere a un producto inmunoglobulínico y al uso de tal producto inmunoglobulínico para fines médicos.

**Antecedentes de la invención**

- 10 La inmunoglobulina normal humana (INH) para uso en la prevención y el tratamiento de una serie de enfermedades infecciosas, se introdujo en la década de 1940. Las INHs preparadas por el método de fraccionamiento con etanol frío según Cohn & Oncley (Cohn E. et al., (1946), J Am Chem Soc, 68, 459-475), (Oncley et al., (1949), J Am Chem Soc, 71, 541-550) y subsecuentemente también por la modificación hecha por Kistler y Nitschmann (Kistler P y Nitschmann HS, (1952), Vox Sang, 7, 414-424) demostraron ser eficaces y estar protegidas contra la transmisión de infecciones víricas, cuando se administraban por vía subcutánea o intramuscular.

- 15 La falta de inmunoglobulina congénita o adquirida, total o parcial (síndrome de inmunodeficiencia primario y secundario, respectivamente) se manifiesta a través de frecuentes infecciones comunes y graves, especialmente de naturaleza bacteriana. La prevención de tales infecciones se logró previamente mediante inyecciones intramusculares o subcutáneas repetidas de grandes cantidades de INH, hasta varias veces a la semana, como un tratamiento de por vida, lo cual es muy doloroso cuando el medicamento se administra por vía intramuscular.

- 20 Por ello, al principio de la década de los 60 se intentó la administración de INH por vía intravenosa. Los ensayos mostraron que aproximadamente el 5% de los voluntarios sanos y aproximadamente el 95% de los pacientes con una deficiencia en inmunoglobulinas, desarrollaba efectos adversos inmediatos que variaban desde disnea hasta choque circulatorio y que eran de naturaleza tan grave que la administración intravenosa de INH tuvo que ser abandonada.

- 25 La razón de los efectos adversos anteriormente mencionados, se debía a agregados de inmunoglobulinas que, entre otros efectos, activaban fuertemente el sistema del complemento. Esto se observó particularmente en pacientes que carecían de inmunoglobulinas. Se pudieron observar efectos adversos especialmente graves de naturaleza anafiláctica en pacientes que desarrollaron anticuerpos contra IgA. En consecuencia, se desarrollaron métodos para evitar la formación de agregados y/o para eliminar estos agregados durante el proceso de preparación, y hace unos veinte años se sometió a ensayo la primera generación de una inmunoglobulina para administración intravenosa (IGIV) y se encontró adecuada.

- 30 La finalidad original de una IGIV era aliviar los episodios infecciosos en pacientes con una falta de inmunoglobulinas congénita o adquirida, total o parcial, y eliminar los malestares relacionados con la administración de INH. Otra ventaja de la IGIV es que se pueden administrar grandes dosis de inmunoglobulina en un corto tiempo, por lo cual es posible obtener de manera muy rápida, concentraciones sanguíneas suficientemente altas. Especialmente cuando se tratan infecciones bacterianas graves, es importante establecer concentraciones elevadas de forma rápida en los sitios de la infección.

- 35 En los últimos años, la IGIV ha mostrado ser eficaz en otras enfermedades graves, cuyo tratamiento podría ser complicado de otra manera, p. ej., hemorragias causadas por la desaparición de las plaquetas sanguíneas sobre una base inmunológica, la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), en algunas enfermedades raras tales como el síndrome de Kawasaki y una variedad de enfermedades autoinmunitarias tales como la polirradiculitis (síndrome de Guillain-Barré). Otras enfermedades cuyo tratamiento ha sido difícil hasta la actualidad están siendo sometidas a ensayos clínicos con IGIV. El mecanismo de acción en estas enfermedades solo se ha esclarecido parcialmente. El efecto se supone que está relacionado con las denominadas propiedades inmunomoduladoras de la IgG, p. ej., un bloqueo de los receptores de Fc $\gamma$  de las células fagocíticas, un incremento del metabolismo de IgG, una regulación a la baja de la producción de citocinas y una interferencia con una supuesta red de idiotipos/antiidiotipos, especialmente relevantes para la neutralización de la reactividad autoinmunitaria.

- 40 La primera generación de IGIV se preparó mediante la escisión con pepsina del material de partida (fracción II de Cohn), siendo el propósito de la escisión retirar los agregados de inmunoglobulina. No se incluyeron en el proceso etapas de cromatografía en columna. El producto tenía que ser liofilizado con el fin de permanecer estable durante un periodo de tiempo razonable y se disolvía inmediatamente antes de su uso.

- 45 El material de partida para la IGIV era INH que había demostrado estar protegida con respecto a la transmisión de virus cuando se utilizaba para inyección intramuscular. Así pues, la IGIV se consideró que estaba protegida. Sin embargo, después de varios años de uso clínico, los productos de IGIV procedentes de algunos fabricantes, mostraron sorprendentemente que causaban la transmisión de una infección con virus de la hepatitis C.

55

Estudios para esclarecer el destino de los virus durante la producción de INH, mostraron que la eliminación del virus en el proceso de fraccionamiento desde plasma a INH, no es muy buena. La protección de las INH para uso intramuscular, es probable que se deba al hecho de que contienen inmunoglobulinas protectoras. En combinación con el modesto volumen inyectado y la vía de administración intramuscular, estas inmunoglobulinas protectoras pueden neutralizar virus comunes en plasma y volverlos no infecciosos. Las infecciones víricas pueden tener lugar especialmente cuando se administran grandes dosis de inmunoglobulinas por vía intravenosa, tal como fue demostrado al principio de la década de 1990. Por lo tanto, se reconoció que los procedimientos de producción deberían comprender una o varias etapas bien definidas de inactivación y/o eliminación de virus.

Una segunda generación de IGIV basada en moléculas de inmunoglobulina sin escindir y sin modificar con baja actividad anticomplementaria y estabilidad elevada, se introdujo a mediados de los 80, pero todavía en forma de producto liofilizado. Esta IGIV se purificaba mediante varias etapas cromatográficas. Los productos de este tipo dominan actualmente el mercado de IGIV. La primera y la segunda generación de IGIV aparecen, por lo tanto, en forma de polvos liofilizados que se disuelven inmediatamente antes de su uso.

La disolución de la IGIV liofilizada es lenta (hasta 30 minutos para un frasco). Frecuentemente, se tienen que disolver varias porciones para un paciente. Como es de alta prioridad para los usuarios tener una IGIV en una solución lista para su uso, se han introducido productos líquidos en el mercado. Lo que es más importante, todavía existe una necesidad de mejorar el procedimiento de producción con el fin de obtener una preparación de IGIV altamente purificada, estable y completamente natural, con mayor eficacia clínica y menos reacciones adversas a los fármacos. Por lo tanto existe una necesidad de un procedimiento adicionalmente desarrollado y mejorado para purificar IgG a partir de plasma crudo o de una fracción proteica plasmática, para obtener un producto de IGIV líquido protegido contra los virus. Finalmente, el procedimiento se debe diseñar de tal manera que pueda ser utilizado en una producción a gran escala.

El procedimiento de purificación descrito en la presente solicitud, lleva a obtener un producto inmunoglobulínico líquido para administración intravenosa que se puede caracterizar como una nueva generación de IGIV altamente purificada, completamente natural, biológicamente activa, doblemente inactivada contra virus y estable, la cual no contiene como estabilizante ningún detergente, polietilenglicol (PEG) o albúmina.

Los documentos WO-A-8606727, WO-A-9429334 y US-A-4296027 describen métodos alternativos para la preparación de inmunoglobulinas.

### **Compendio de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento de purificación mejorado y a un producto inmunoglobulínico líquido mejorado el cual, entre otras cosas, se puede administrar por vía intravenosa.

Un producto inmunoglobulínico obtenido por el método de la presente invención, se podría denominar IGIV de tercera generación. El procedimiento se caracteriza por las siguientes condiciones para el fraccionamiento: se evita la escisión con pepsina, los agregados y las partículas se eliminan por precipitación (una etapa del procedimiento validada para actuar como etapa de eliminación de virus), se logra una purificación adicional por métodos cromatográficos en columna de intercambio iónico, se introduce un tratamiento con S/D como etapa inactivadora de virus y la preparación se formula en forma de un producto líquido.

Debido a la pureza mejorada del producto inmunoglobulínico obtenible por el procedimiento de la invención, en comparación con los productos de la técnica anterior, no es necesaria la adición de estabilizantes tales como un detergente no iónico, PEG o albúmina, con el fin de evitar la agregación de IgG durante el almacenamiento de la IGIV como un producto líquido. El producto obtenible por el procedimiento de la invención tiene mejor calidad que los productos de la técnica anterior y proporciona mejores efectos clínicos, y los efectos adversos no deseables, están prácticamente ausentes.

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar inmunoglobulinas, es decir, IgG, a partir de plasma crudo o de una fracción proteica plasmática que contiene inmunoglobulina, en donde el procedimiento comprende las etapas de:

(a) preparar una suspensión acuosa de la fracción proteica plasmática que contiene inmunoglobulina cruda;

(b) añadir un agente precipitante de proteínas hidrosoluble, sustancialmente no desnaturizante, a dicha suspensión de la etapa (a) en una cantidad suficiente para causar la precipitación de una elevada proporción de proteínas no inmunoglobulinas G, inmunoglobulinas agregadas y partículas incluyendo partículas potencialmente infecciosas tales como partículas víricas, sin causar una precipitación sustancial de la inmunoglobulina G monomérica, formando de esta manera una mezcla de un precipitado sólido y un material sobrenadante líquido;

(c) recuperar un material sobrenadante clarificado que contiene inmunoglobulina G a partir de la mezcla de la

etapa (b);

(d) aplicar el material sobrenadante clarificado que contiene inmunoglobulina G de la etapa (c) a una resina de intercambio aniónico y subsecuentemente a una resina de intercambio catiónico;

5 (e) eliminar por lavado los contaminantes proteicos y las proteínas precipitadas procedentes de la resina de intercambio catiónico con un tampón que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para eliminar los contaminantes de la resina sin causar una elución sustancial de la inmunoglobulina G;

(f) eluir la inmunoglobulina G desde la resina de intercambio catiónico con un tampón sustancialmente no desnaturizante que tiene un valor de pH y una fuerza iónica suficientes para causar una elución eficaz de la inmunoglobulina G, recuperando de esta manera un eluido que contiene inmunoglobulina G;

10 (g) realizar una diafiltración/ultrafiltración del eluido que contiene inmunoglobulina G de la etapa (f) para concentrar y/o dializar el eluido y añadir opcionalmente un agente estabilizante;

(h) añadir una cantidad viricida de agente inactivador de virus a la fracción dializada/ultrafiltrada que contiene inmunoglobulina G y opcionalmente estabilizada de la etapa (g), obteniéndose como resultado una solución sustancialmente protegida contra virus que contiene inmunoglobulina G;

15 (i) aplicar la solución que contiene inmunoglobulina G de la etapa (h) a una resina de intercambio aniónico y subsecuentemente a una resina de intercambio catiónico;

(j) lavar la resina de intercambio catiónico de la etapa (i) con un tampón que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para eliminar por lavado los contaminantes proteicos y el agente inactivador de virus de la resina, sin causar una elución sustancial de la inmunoglobulina G;

20 (k) eluir la inmunoglobulina G de la resina de intercambio catiónico de la etapa (j) con un tampón sustancialmente no desnaturizante que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para causar una elución eficaz de la inmunoglobulina G, recuperando de esta manera un eluido que contiene inmunoglobulina G; y

25 (l) someter el eluido que contiene inmunoglobulina G de la etapa (k) a una diafiltración/ultrafiltración para disminuir la fuerza iónica y concentrar la inmunoglobulina G de la solución, y ajustar la osmolaridad mediante la adición de un sacárido.

El material de partida del presente procedimiento de purificación puede ser plasma crudo, pero ventajosamente es una fracción proteica plasmática cruda que contiene inmunoglobulinas. El material de partida para el procedimiento de purificación puede ser plasma humano normal o puede provenir de donantes con títulos elevados de anticuerpos específicos, p. ej., plasma hiperimmune. En la presente descripción, la expresión "fracción plasmática que contiene inmunoglobulinas" abarca todos los materiales de partida posibles para el presente procedimiento, p. ej., plasma exento de crioprecipitado o plasma exento de crioprecipitado a partir del cual se han eliminado varias proteínas plasmáticas, tales como el factor IX y la antitrombina, diferentes fracciones de Cohn y fracciones obtenidas a través de procedimientos de precipitación mediante PEG (Polson et al. (1964), *Biochem Biophys Acta*, 82, 463-475; Polson y Ruiz-Brazo, (1972) *Vox Sang*, 23, 107-118) o con sulfato de amonio. En una realización preferida, la fracción proteica plasmática incluye las fracciones II y III de Cohn, pero se puede utilizar también la fracción II de Cohn o las fracciones I, II y III de Cohn. Las diferentes fracciones de Cohn se preparan preferentemente a partir de plasma por el método de fraccionamiento convencional de Cohn, esencialmente tal como fue modificado por Kistler-Nitschmann. Además de las inmunoglobulinas, las fracciones de Cohn contienen, por ejemplo, fibrinógeno,  $\alpha$ -globulinas y  $\beta$ -globulinas, incluyendo varias lipoproteínas, las cuales se eliminarán preferentemente durante el procedimiento de purificación posterior. Adyuvantes de la filtración pueden estar presentes o no, dependiendo del método de aislamiento utilizado para obtener las fracciones de Cohn (es decir, centrifugación o filtración).

La primera etapa del procedimiento según la invención, incluye preparar una suspensión acuosa de una fracción proteica plasmática que contiene inmunoglobulinas, en donde la concentración de IgG en la suspensión es suficientemente elevada para que, durante la siguiente etapa de precipitación, una gran proporción de las proteínas no IgG, especialmente aquellas con un peso molecular más elevado, las inmunoglobulinas agregadas y otras proteínas agregadas, así como partículas potencialmente infecciosas, precipiten sin que haya una precipitación sustancial de la IgG monomérica. Esto se logra generalmente si la concentración de IgG en la suspensión tamponada y filtrada es de al menos aproximadamente 4 g/L, antes de la adición del agente precipitante. Se debe tener en consideración que la influencia de la concentración proteica así como del pH y la temperatura de la suspensión sobre la precipitación, depende del agente precipitante seleccionado.

Se prefiere que la fracción proteica plasmática se suspenda en agua y/o tampón a una temperatura y pH sustancialmente no desnaturizantes. La expresión "sustancialmente no desnaturizante" implica que la condición a la que se refiere el término no causa una pérdida sustancial irreversible de la actividad funcional de las moléculas de IgG, p. ej., la pérdida de la actividad de unión al antígeno y/o la pérdida de la función de Fc biológica (véase el Ejemplo 2).

- 5 Ventajosamente, la fracción proteica plasmática se suspende en agua acidificada con al menos un sistema tamponador no desnaturalizante a volúmenes de 6 a 9 veces, preferentemente de 7 a 8 veces el de la fracción proteica plasmática. El pH de la suspensión que contiene inmunoglobulinas se mantiene preferentemente a pH inferior a 6, tal como en el intervalo de 4,0 a 6,0, preferiblemente de 5,1 a 5,7, más preferiblemente aproximadamente 5,4, con el fin de asegurar una solubilidad óptima de la inmunoglobulina y para asegurar un efecto óptimo de la subsecuente etapa de precipitación con PEG. Se puede utilizar cualquier tampón ácido adecuado, pero el sistema tamponador contiene preferentemente al menos uno de los siguientes tampones y ácidos: fosfato sódico, acetato sódico, ácido acético, HCl. Los técnicos en la materia observarán que se pueden utilizar muchos otros tampones.
- 10 La suspensión de inmunoglobulina se mantiene preferentemente a una temperatura fría, entre otros, con el fin de evitar una desnaturalización proteica sustancial y para minimizar la actividad proteasa. La suspensión de inmunoglobulina y agua, así como el sistema tamponador añadido, tienen preferentemente la misma temperatura dentro del intervalo de 0-12°C, preferentemente de 0-8°C, más preferiblemente de 1-4°C.
- 15 La suspensión de una pasta precipitada con etanol contiene cantidades relativamente elevadas de material proteico agregado. Opcionalmente, la suspensión que contiene inmunoglobulinas se filtra con el fin de eliminar, p. ej., los agregados grandes, el adyuvante de la filtración, si lo hay, y la pasta residual no disuelta. La filtración se lleva a cabo preferentemente por medio de filtros de profundidad, p. ej., C150 AF, AF 2000 o AF 1000 (Schenk), 30LA (Cuno) o filtros similares. La eliminación de agregados, adyuvantes de la filtración si los hay, y material proteico residual no disuelto, también se puede llevar a cabo mediante centrifugación.
- 20 Se añade al menos un agente precipitante de proteínas, sustancialmente no desnaturalizante e hidrosoluble, a la suspensión filtrada que contiene inmunoglobulinas, en una cantidad suficiente para causar la precipitación de una elevada proporción de proteínas de peso molecular elevado, lipoproteínas, proteínas agregadas, entre estas inmunoglobulinas agregadas. Otros materiales en partículas, tales como partículas potencialmente infecciosas, p. ej., partículas víricas, también precipitan sin causar la precipitación sustancial de IgG monomérica. La expresión "partículas infecciosas" en el presente contexto, comprende, p. ej., partículas víricas (tales como virus de la hepatitis, VIH 1 y VIH 2) y bacterias.
- 25 Los agentes precipitantes de proteínas sustancialmente no desnaturalizantes e hidrosolubles son bien conocidos en el campo de la purificación de proteínas. Tales agentes precipitantes se utilizan para fraccionar proteínas, dando como resultado la purificación parcial de proteínas a partir de suspensiones. Los agentes precipitantes de proteínas adecuados para ser utilizados en el procedimiento de la presente invención, incluyen PEG con varias formas de peso molecular, ácido caprílico y sulfato de amonio. Los técnicos en la materia observarán que se pueden utilizar otros agentes precipitantes hidrosolubles y no desnaturalizantes como medios alternativos para la precipitación. La expresión "añadir un agente precipitante de proteínas" y variantes de esta expresión, implican la adición de uno o varios tipos de agentes de precipitación de proteínas.
- 30 Un agente precipitante preferido es el agente orgánico PEG, particularmente PEG dentro del intervalo de peso molecular de 3000 a 8000 Da, tal como PEG 3350, PEG 4000, PEG 5000 y especialmente PEG 6000 (los números de estos compuestos de PEG específicos representan su peso molecular promedio). La ventaja de utilizar PEG como agente precipitante es que PEG no es iónico y tiene propiedades estabilizadoras de proteínas, p. ej., PEG a una concentración baja es bien conocido como estabilizador de productos IGIV. La etapa de precipitación también actúa como etapa de eliminación de virus. El PEG concentra y precipita los virus, independientemente de la especie, del tamaño y del revestimiento de superficie de los mismos.
- 35 Una cantidad dada de agente precipitante de proteína se añade a la suspensión filtrada para precipitar la mayoría de las proteínas y partículas de alto peso molecular y agregadas, sin una precipitación sustancial de la IgG monomérica, formando una solución clara de material sobrenadante. El agente precipitante de proteínas se puede añadir como sólido en polvo o en forma de una solución concentrada.
- 40 Para el PEG como agente precipitante se aplica una regla general, de que cuanto mayor sea el peso molecular del compuesto, menor será la concentración de PEG necesaria para causar la precipitación de las proteínas. Cuando se utiliza PEG 3350, PEG 4000 o preferentemente PEG 6000, la concentración del agente precipitante en la suspensión filtrada, está ventajosamente en el intervalo de 3-15% en peso, tal como de 4-10% (tal como aproximadamente 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%), en donde 6% es la cantidad más preferida. En la etapa de precipitación, se permite que el procedimiento de precipitación proceda al menos hasta que se alcance un equilibrio entre la fase sólida y la líquida, p. ej., normalmente durante al menos dos horas, tal como aproximadamente de 2 a aproximadamente 12 horas, preferentemente aproximadamente 4 horas. Durante la precipitación, la suspensión se mantiene preferentemente a baja temperatura (p. ej., menos de aproximadamente 12°C, tal como menos de aproximadamente 10°C, preferentemente entre 2°C y 8°C). La temperatura más adecuada depende de la identidad del agente precipitante de proteínas.
- 45 Después de concluir la precipitación de proteínas, un material sobrenadante clarificado que contiene IgG casi exclusivamente en forma monomérica, es recuperado de la mezcla de precipitado sólido y material sobrenadante líquido resultante de la precipitación. La recuperación se puede realizar por técnicas convencionales para separar líquidos de fases sólidas, tales como centrifugación y/o filtración. Preferentemente se utiliza una centrifuga de flujo (p. ej., Westfalia) con una fuerza de 1000 a 5000 g.
- 50
- 55

Opcionalmente, el material sobrenadante recuperado clarificado que contiene IgG, se filtra en profundidad para eliminar las partículas grandes y los agregados. Esto es seguido opcionalmente por una filtración estéril realizada mediante el uso de un filtro de esterilización convencional (tal como un filtro de 0,22 µm de Millipore o Sartorius), que elimina, p. ej., las bacterias de la solución.

5 El material sobrenadante clarificado y opcionalmente filtrado que contiene IgG, se somete a al menos una etapa, por ejemplo dos etapas, pero opcionalmente más etapas de cromatografía de intercambio aniónico y catiónico, con el fin de eliminar una proporción sustancial de los contaminantes restantes no IgG, por ejemplo IgA, albúmina así como agregados. En una realización preferida, el material sobrenadante clarificado y opcionalmente filtrado que contiene  
10 IgG se aplica a una resina de intercambio aniónico y subsecuentemente a una resina de intercambio catiónico, cargadas en dos columnas de dimensiones apropiadas.

15 Cuando se realizan las etapas de cromatografía de intercambio iónico para la purificación de IgG, se prefiere que las condiciones, p. ej., el pH y la fuerza iónica, se seleccionen de tal manera que una gran porción de los contaminantes (p. ej., proteínas que no son IgG, tal como IgA, transferrina, albúmina, y agregados) en la solución aplicada, se una a la resina de intercambio aniónico, mientras que sustancialmente ninguna IgG se adsorba a la resina de intercambio aniónico. Con respecto a la subsecuente cromatografía de intercambio catiónico, las condiciones preferidas seleccionadas dan como resultado la unión de sustancialmente todas las moléculas de IgG presentes en la solución aplicada a la resina de intercambio catiónico. Los contaminantes proteicos no adsorbidos a la resina de intercambio aniónico y el agente de precipitación, son eliminados en el lavado posterior de la resina de intercambio catiónico.

20 En una realización preferida del presente procedimiento, la resina de intercambio aniónico y la resina de intercambio catiónico se conectan en serie. En el presente contexto, la expresión "conectadas en serie", cuando se utiliza con referencia a las resinas de intercambio iónico, significa que las proteínas que pasan a través de la resina de intercambio aniónico se cargan directamente en la resina de intercambio catiónico, sin cambio de tampón ni de otras condiciones.

25 Existen varias razones que hacen ventajoso que la cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía de intercambio catiónico se realicen en una sola etapa, utilizando dos columnas cromatográficas conectadas en serie, en lugar de dos etapas cromatográficas independientes, p. ej., con diferentes composiciones tampón. El uso de dos columnas cromatográficas conectadas en serie vuelve más práctica la operación, p. ej., no hay necesidad de una etapa intermedia de recogida de la fracción que contiene IgG entre los dos métodos de cromatografía de intercambio iónico, para un posible ajuste del pH y la fuerza iónica. Además, el flujo del tampón se aplica a ambas columnas al mismo tiempo y las dos columnas se equilibran con el mismo tampón. Sin embargo, se contempla que también es posible realizar la etapa cromatográfica en dos etapas, es decir, la resina de intercambio aniónico y la resina de intercambio catiónico no están conectadas en serie. Realizar la cromatografía en dos etapas, tal como se ha mencionado anteriormente, sería más laborioso que mantener las resinas de intercambio iónico conectadas en serie.

30 Actualmente se contempla que el alto grado de pureza, el alto contenido en monómeros y dímeros de IgG y el bajo contenido en IgA en el producto IGIV de la presente invención, se deben parcialmente al uso de dos columnas cromatográficas conectadas en serie.

35 Como será evidente para un técnico en la materia, los intercambiadores iónicos se pueden basar en diversos materiales con respecto a la matriz, así como a los grupos cargados fijados. Por ejemplo, se pueden utilizar las siguientes matrices, en las cuales los materiales mencionados pueden estar más o menos reticulados: basadas en agarosa (tales como Sepharose CL-6B<sup>®</sup>, Sepharose Fast Flow<sup>®</sup> y Sepharose High Performance<sup>®</sup>), basadas en celulosa (tal como DEAE Sephacel<sup>®</sup>), basadas en dextrano (tal como Sephadex<sup>®</sup>), basadas en sílice y basadas en polímeros sintéticos. Para la resina de intercambio aniónico, los grupos cargados que se fijan covalentemente a la matriz pueden ser, por ejemplo, dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y/o amonio cuaternario (Q). Para la resina de intercambio catiónico, los grupos cargados que están fijados covalentemente a la matriz, pueden ser, p. ej., carboximetilo (CM), sulfopropilo (SP) y/o sulfonato de metilo (S). En una realización preferida del presente procedimiento, la resina de intercambio aniónico empleada es DEAE Sepharose Fast Flow<sup>®</sup>, pero se pueden utilizar otros intercambiadores de aniones. Una resina de intercambio catiónico preferida es CM Sepharose Fast Flow<sup>®</sup>, pero también se pueden utilizar otros intercambiadores de cationes.

40 El volumen apropiado de resina utilizado cuando se carga en una columna cromatográfica de intercambio iónico, se ve reflejado por las dimensiones de la columna, es decir, el diámetro de la columna y la altura de la resina, y varía dependiendo, por ejemplo, de la cantidad de IgG en la solución aplicada y la capacidad de unión de la resina utilizada.

45 Antes de realizar una cromatografía de intercambio iónico, la resina de intercambio iónico se equilibra preferentemente con un tampón que permite que la resina se una a sus contraiones. Preferentemente, las resinas de intercambio aniónico y catiónico se equilibran con el mismo tampón, ya que esto facilita el procedimiento, puesto que solo se tiene que preparar y utilizar un tampón.

50 Por ejemplo, si la resina de intercambio aniónico seleccionada es DEAE Sepharose FF<sup>®</sup> y la resina de intercambio catiónico es CM Sepharose FF<sup>®</sup> y las columnas se conectan en serie, entonces ambas columnas están ventajosa-

mente equilibradas con un tampón ácido no desnaturizante que tiene aproximadamente el mismo pH y fuerza iónica que la solución de IgG que se va a cargar. Es adecuado cualquiera entre una variedad de tampones para equilibrar las columnas de intercambio iónico, p. ej., acetato sódico, fosfato sódico, tris(hidroximetil)amino-metano. Los expertos en la materia observarán que se pueden utilizar muchos otros tampones para equilibrar, siempre que el pH y la conductividad sean aproximadamente iguales a los de la solución de IgG aplicada. Un tampón preferido para equilibrar la columna de intercambio aniónico y la columna de intercambio catiónico cuando se conectan en serie, es un tampón de acetato sódico que tiene una concentración de acetato sódico dentro del intervalo de 5-25 mM, tal como dentro del intervalo de 10-20 mM, preferentemente aproximadamente 15 mM. Se prefiere que el pH del tampón de acetato sódico utilizado para equilibrar, esté dentro del intervalo de 5,0 a 6,0, tal como dentro del intervalo de 5,4-5,9, preferentemente aproximadamente 5,7. La conductividad está dentro del intervalo de 1,0-1,4 mS/cm, preferentemente aproximadamente 1,2 mS/cm. Los tampones de acetato adecuados se pueden preparar con trihidrato de acetato sódico y ácido acético glacial.

Antes de cargar el material sobrenadante clarificado y opcionalmente filtrado que contiene IgG en las columnas de intercambio iónico, la concentración del tampón y el pH de dicho material sobrenadante se ajustan preferentemente, si es necesario, a valores sustancialmente equivalentes a la concentración y el pH del tampón de equilibrado empleado.

Después de cargar el material sobrenadante que contiene IgG en columnas en serie, las columnas se lavan (lavado inicial) preferentemente con un volumen de columna de un tampón de lavado, con el fin de asegurar que la solución que contiene IgG se transfiera cuantitativamente desde la columna de intercambio aniónico a la columna de intercambio catiónico. Subsecuentemente, las columnas de intercambio aniónico y catiónico se desconectan y la columna de intercambio catiónico se lava con el fin de eliminar los contaminantes proteicos procedentes de la resina, preferentemente con un tampón que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para eluir sustancialmente todos los contaminantes de la resina de intercambio catiónico, sin causar una elución sustancial de la IgG.

El lavado inicial se realiza ventajosamente utilizando el tampón de equilibrado, aunque para el lavado se pueden utilizar otros tampones con valores similares de concentración y pH. Se prefiere el uso de un tampón de acetato para eliminar por lavado los contaminantes procedentes de la resina de intercambio catiónico. El pH del tampón puede ser de 5,0 a 6,0, tal como en el intervalo de 5,2-5,8, tal como aproximadamente 5,4.

La elución de la IgG a partir de la resina de intercambio catiónico se realiza preferentemente con un tampón sustancialmente no desnaturizante que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para causar una elución eficaz de la IgG, recuperando de esta manera un eluido que contiene IgG. En este contexto, el término elución eficaz significa que al menos el 75%, tal como al menos 80%, p. ej., al menos el 85% de las proteínas IgG cargadas en las resinas de intercambio aniónico y catiónico en serie, se eluyen de la resina de intercambio catiónico. La elución se lleva a cabo ventajosamente en forma de una etapa de elución en gradiente. En el procedimiento de la presente invención, el tampón preferido utilizado es acetato sódico que tiene un pH dentro del intervalo de 5,0-6,0, tal como de 5,2-5,8, preferiblemente aproximadamente 5,4 y una concentración dentro del intervalo de 5-40 mM, tal como dentro del intervalo de 10-25 mM, preferentemente aproximadamente 15 mM.

Se prefiere que la concentración de sales del tampón de elución sea suficientemente alta para desplazar la IgG de la resina. Sin embargo, se contempla que se puede utilizar un incremento de pH y una concentración de sales más baja para eluir la IgG de la resina. En una realización preferida del presente procedimiento, la elución se lleva a cabo en forma de una elución continua en gradiente salino, con concentraciones de cloruro sódico dentro del intervalo de 5-500 mM, preferentemente cloruro sódico desde aproximadamente 125 mM a aproximadamente 350 mM.

La elución también se puede llevar a cabo eluyendo con un gradiente por etapas. Se contempla que la elución también se puede realizar en forma de una elución con sal constante, en la cual el tampón de elución aplicado a la columna de intercambio catiónico solamente tiene una concentración de sal, en contraste con la elución en gradiente. Si se realiza una elución con sal constante, la concentración salina puede estar ventajosamente dentro del intervalo desde aproximadamente 350 mM a aproximadamente 500 mM de cloruro sódico. La ventaja de la elución en gradiente, en comparación con la elución con sal constante, es que la elución es más eficaz con un gradiente salino, pero otra ventaja es que el eluido tiene una fuerza iónica menor, lo cual es ventajoso debido a que una fuerza iónica elevada es peligrosa para la estabilidad de la IgG. El tampón de elución puede comprender además un agente estabilizante de proteínas, tal como los que se mencionarán más adelante. Se pueden utilizar otros sistemas diversos de tampón, adecuados para eluir la IgG, tal como apreciarán los técnicos en la materia.

Preferentemente, se aplica al menos un agente estabilizante de proteínas a la fracción de IgG, inmediatamente después de la elución o durante la misma. Los agentes estabilizantes de proteínas son conocidos por los técnicos en la materia e incluyen, por ejemplo, diferentes alcoholes de azúcar y sacáridos (tales como sorbitol, manosa, glucosa, trehalosa, maltosa), proteínas (tales como albúmina), aminoácidos (tales como lisina, glicina) y agentes orgánicos (tales como PEG). Ventajosamente, el agente estabilizante intermedio seleccionado puede ser uno que se puede eliminar de la solución que contiene IgG en las etapas posteriores.

La concentración adecuada de agente estabilizante de proteínas en la solución que contiene IgG, depende del agente específico empleado. En una realización preferida, el agente estabilizante es sorbitol, preferentemente con una

concentración final dentro del intervalo de 2-15% (p/v) de sorbitol, p. ej., aproximadamente 2,5%.

Después de la elución desde la columna de intercambio catiónico, el eluido se desaliniza preferentemente (es decir, se dializa) y se concentra ventajosamente. El cambio de tampón y la concentración de IgG se pueden realizar mediante un procedimiento combinado de diafiltración/ultrafiltración. El término "diafiltración/ultrafiltración" significa que la diálisis y la concentración mediante diafiltración y ultrafiltración, respectivamente, se realizan en una sola etapa. Se contempla que la diafiltración y la ultrafiltración se pueden realizar como dos etapas separadas. Sin embargo, con el fin de evitar una pérdida innecesaria de producto, actualmente se prefiere realizar la diálisis y la concentración por métodos de diafiltración y ultrafiltración en una sola etapa.

Las membranas empleadas para la diafiltración/ultrafiltración tienen ventajosamente un corte de peso nominal dentro del intervalo de 10.000-100.000 Da. Un tipo de membrana preferido para el presente procedimiento es una membrana de polisulfona con un corte de peso nominal de 30.000 Da, comercializada por Millipore. Se pueden emplear otras membranas de ultrafiltración de material y porosidad comparables.

El grado de concentración puede variar considerablemente. La solución se concentra desde aproximadamente 10 g/L de IgG hasta aproximadamente 100 g/L, preferentemente hasta aproximadamente 50 g/L. Después de la concentración, el concentrado de IgG se dializa ventajosamente frente a un tampón con fuerza iónica baja. Además de eliminar los iones de sal, esta etapa también elimina contaminantes de bajo peso molecular de la solución y proporciona un mecanismo para el intercambio de tampón para la siguiente etapa de purificación. Un tampón preferido para la diafiltración es acetato sódico 15 mM, pH 5,4 que contiene 2,5% (p/v) de sorbitol. El intercambio de tampón continúa hasta que la conductividad de la solución ultrafiltrada se reduce hasta un valor menor de aproximadamente 1,5 mS/cm, preferentemente menor de aproximadamente 1,3 mS/cm. Durante la diafiltración/ultrafiltración, el pH se mantiene preferentemente dentro del intervalo de 4,0-6,0, preferentemente de 5,1-5,7, más preferiblemente a aproximadamente 5,4.

Después de la diafiltración/ultrafiltración, la concentración del agente estabilizante de proteínas se ajusta ventajosamente en la solución, si es necesario, a la concentración final óptima, característica para el agente estabilizante de proteínas específico empleado. Si se emplea sorbitol, la concentración de sorbitol se ajusta preferentemente a aproximadamente 10% en peso.

Se prefiere que la solución estabilizada se filtre con un filtro que tenga un diámetro de poro dentro del intervalo de 0,2-1,0  $\mu\text{m}$ , preferentemente aproximadamente 0,45  $\mu\text{m}$ , con el fin de eliminar los agregados antes de la siguiente etapa. En esta etapa, la solución que contiene IgG tiene un aspecto de solución transparente de volumen apropiado con una estabilidad elevada, como resultado combinado de la pureza elevada, la fuerza iónica baja, el pH ácido, la concentración de IgG relativamente alta y el agente estabilizante añadido.

En el procedimiento de producción del producto IGIV, se incorporan actualmente al menos dos etapas definidas y validadas de eliminación e inactivación de los virus, en donde estas etapas son preferentemente la precipitación con PEG como etapa de eliminación de virus general y un tratamiento con S/D como etapa inactivadora de virus contra los virus con envuelta lipídica. Además de los estrictos requerimientos de seguridad contra virus de los materiales de partida, según las normas internacionales, y de la capacidad reductora de virus bien conocida de un procedimiento de purificación de etapas múltiples, la incorporación de dos etapas de reducción vírica independientes que son activas contra los virus con envuelta y sin envuelta, el medicamento de la presente invención está sustancialmente protegido contra los virus.

Los virus infecciosos con envuelta lipídica que todavía pudieran estar presentes en la solución que contiene IgG, son inactivados preferentemente en este estadio del procedimiento, mediante la adición a la solución que contiene IgG de una cantidad viricida de un agente inactivador de virus. Una "cantidad viricida" de agente inactivador de virus, significa una cantidad que da origen a una solución en la cual las partículas víricas se han vuelto sustancialmente no infecciosas, y por ello, una "solución que contiene IgG protegida contra virus" tal como se define en la técnica. Tal "cantidad viricida" dependerá del agente inactivador de virus empleado, así como de condiciones tales como el tiempo de incubación, el pH, la temperatura, el contenido en lípidos y la concentración de proteínas.

La expresión "agente inactivador de virus" significa un agente o un método que se puede utilizar con el fin de inactivar virus con envuelta lipídica, así como virus sin envuelta lipídica. La expresión "agente inactivador de virus" debe entenderse que abarca una combinación de tales agentes y/o métodos, siempre y cuando sea apropiada, así como un solo tipo de tales agentes o métodos.

Los agentes inactivadores de virus preferidos son detergentes y/o disolventes, lo más preferentemente mezclas de detergente/disolvente. Debe entenderse que el agente inactivador de virus es opcionalmente una mezcla de uno o varios detergentes con uno o varios disolventes. El tratamiento con disolvente/detergente (S/D) es una etapa, ampliamente utilizada para inactivar virus con envuelta lipídica (p. ej., VIH1 y VIH2, virus de la hepatitis de tipo C y no A-B-C, VLTH 1 y 2, la familia del virus herpes, incluyendo CMV y virus de Epstein-Barr) en productos sanguíneos. Se puede utilizar una amplia variedad de detergentes y disolventes para la inactivación de virus. El detergente se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en detergentes no iónicos y iónicos, y se selecciona de modo que sea sustancialmente no desnaturalizante. Preferentemente se utiliza un detergente no iónico, ya que facilita la elimina-



ción posterior del detergente desde la preparación de IgG en las etapas posteriores. Los detergentes adecuados se describen, p. ej., en Shanbrom et al., en los documentos de Patentes Norteamericanas 4.314.997 y 4.315.919. Los detergentes preferidos son aquellos que se comercializan con las marcas Triton X-100 y Tween 80. Los disolventes preferidos para utilizar en agentes inactivadores de virus son dialquilfosfatos o trialquilfosfatos, como los descritos, p. 5 ej., por Neurath y Horowitz en el documento de Patente Norteamericana 4.764.369. Un disolvente preferido es tri(n-butil)fosfato (TNBP). Un agente inactivador de virus especialmente preferido para la práctica de la presente invención, es una mezcla de TNBP y Tween 80, pero alternativamente se pueden utilizar otras combinaciones. La mezcla preferida se añade en un volumen tal que la concentración de TNBP en la solución que contiene IgG está dentro del intervalo de 0,2-0,6% en peso, preferentemente a una concentración de aproximadamente 0,3% en peso. La concentración de Tween 80 en la solución que contiene IgG está dentro del intervalo de 0,8-1,5% en peso, preferente- 10 mente a una concentración de aproximadamente 1% en peso.

La etapa de inactivación vírica se lleva a cabo en condiciones que inactivan los virus con envuelta, dando como resultado una solución que contiene IgG sustancialmente protegida contra virus. En general, tales condiciones incluyen una temperatura de 4-30°C, tal como 19-28°C, 23-27°C, preferentemente aproximadamente 25°C, y un tiempo 15 de incubación que sea eficaz por medio de estudios de validación. Generalmente es suficiente un tiempo de incubación de 1 a 24 horas, preferentemente de 4 a 12 horas, tal como aproximadamente 6 horas, para asegurar una inactivación suficiente de los virus. Sin embargo, las condiciones apropiadas (temperatura y tiempos de incubación) dependen del agente inactivador de virus empleado, del pH y de la concentración de proteínas y del contenido en lípidos de la solución.

Se contempla que también se pueden emplear otros métodos para la eliminación o la inactivación de virus, para producir un producto protegido contra virus, tal como la adición de azul de metileno con la subsecuente inactivación por radiación con luz ultravioleta o nanofiltración. 20

Después del tratamiento con disolvente/detergente, la solución se diluye ventajosamente con un tampón. Opcionalmente, la solución que contiene IgG sustancialmente protegida contra virus se filtra, preferentemente a través de un 25 filtro de profundidad como los previamente descritos en una etapa anterior del presente procedimiento y/o a través de un filtro estéril.

Después de la inactivación del virus y preferiblemente filtración, se realiza la cromatografía de intercambio iónico con el fin de eliminar el agente inactivador de virus y los contaminantes proteicos. Esta etapa se realiza preferentemente de la manera ya descrita para la etapa previa de cromatografía de intercambio iónico en el presente procedimiento, con la excepción de que el volumen de una resina de intercambio aniónico es aproximadamente la mitad del de la 30 resina de intercambio catiónico y que el lavado antes de eluir la IgG es más exhaustivo, utilizándose al menos seis volúmenes de la columna, de tampón. Adicionalmente, en una realización preferida de la invención, el tampón de equilibrado es acetato sódico a una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 5-25 mM, preferentemente 15 mM y un pH dentro del intervalo de aproximadamente 5,0-5,8, preferentemente 5,4. Tal y como se ha mencionado previamente, el contenido en acetato sódico y el pH de la solución que contiene IgG se ajustan preferentemente a la misma concentración y pH que el tampón de equilibrado. Adicionalmente, en una realización preferida de la invención, se añade un agente estabilizador de proteínas, preferentemente maltosa, al eluido recuperado hasta tener una concentración final dentro del intervalo de 1-5%, preferentemente de aproximadamente 2,5% en peso. 35

El método preferido para eliminar el agente inactivador de virus, es mediante cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, también están contemplados como útiles otros métodos tales como la extracción en aceite y métodos cromatográficos alternativos. El método apropiado depende del agente inactivador de virus empleado. La eliminación del disolvente/detergente, se puede realizar entonces uniendo la IgG a una resina y eliminando subsecuentemente el agente inactivador con un lavado a fondo con tampón. La cromatografía de intercambio catiónico es un método 40 que se puede utilizar. En una realización preferida de la presente invención, también se realiza una cromatografía de intercambio aniónico además de la cromatografía de intercambio catiónico, con el fin de mejorar la calidad y la pureza global del producto final del presente procedimiento. 45

Después de la etapa de cromatografía de intercambio iónico, el eluido que contiene IgG, preferentemente se dializa y se concentra; de esta manera el contenido en componentes proteicos más pequeños restantes también se reduce eficazmente. De manera ventajosa, esto se puede llevar a cabo mediante diafiltración/ultrafiltración tal y como se describió anteriormente. El tampón empleado para la diafiltración es acetato sódico, preferentemente a una concentración de aproximadamente 4 a 10 mM, preferiblemente 7,5 mM y a un pH dentro del intervalo desde aproximadamente 4,0 a 6,0, preferentemente de aproximadamente 5,1 a 5,7, tal como aproximadamente 5,4. Alternativamente, se pueden utilizar otros tampones tales como fosfato sódico o ácidos para la diafiltración. La diafiltración continúa 50 hasta que la conductividad es menor o igual a 1 mS/cm. Opcionalmente, la solución que contiene IgG se esteriliza mediante una filtración estéril adicional. 55

Si se desea, la solución que contiene IgG purificada que está sustancialmente exenta del agente inactivador de virus, es sometida a otros tratamientos con el fin de hacerla adecuada para formulación como producto líquido para ser administrado, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular.

Desde un punto de vista práctico, se prefiere que el contenido de la formulación líquida del producto inmunológico sea el mismo para el almacenamiento y para el uso. La concentración final de IgG en el producto está preferentemente en el intervalo de 0,25-20% en peso (que se corresponde a una cantidad de 2,5-200 g de IgG/L), tal como aproximadamente 1-20%, es decir, aproximadamente 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%.

Se sabe que una concentración elevada de proteínas da como resultado una mayor estabilidad de IgG. Por otro lado, una concentración elevada de IgG significa que la tasa de infusión máxima cuando la IgG se administra por vía intravenosa al paciente, tiene que ser muy baja con el fin de evitar los problemas de transfusión debidos a la elevada presión osmótica del producto. Una concentración actualmente recomendada por la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) para la administración intravenosa es de 5% (p/v). Por otro lado, un producto muy concentrado (p. ej., 10% o superior) sirve ventajosamente para inyecciones intramusculares o subcutáneas.

Aunque no es preferido, es evidente que los productos obtenibles a través de las diversas etapas del procedimiento de la invención también se pueden utilizar, por ejemplo, como productos liofilizados en vez de formulaciones líquidas, aunque esto es menos favorable en comparación con el uso de los productos inmunoglobulínicos en forma de formulaciones líquidas listas para usar. Esta última realización se describirá con mayor detalle más adelante.

Los productos inmunoglobulínicos líquidos son más estables con una fuerza iónica marcadamente inferior que la del plasma, es decir, la conductividad es preferentemente menor de 1,0 mS/cm, preferentemente de aproximadamente 0,8 mS/cm.

El pH tiene un efecto sobre la estabilidad de IgG y sobre la tasa de infusión. Los productos inmunoglobulínicos líquidos son más estables en condiciones ácidas, es decir, por debajo del punto isoeléctrico de la IgG, pH 6,4-8,5. Cuanto más cercano esté el valor del pH al valor del pH fisiológico (7,1-7,3), se podrá emplear una tasa de infusión superior. Como consecuencia de la estabilidad requerida, el pH del producto inmunoglobulínico de la invención estará preferentemente dentro del intervalo de 5,1-5,7, tal como entre 5,2 y 5,6, tal como aproximadamente 5,4.

Además, el producto inmunoglobulínico puede comprender agentes estabilizadores de proteínas como los previamente descritos. Además de alcoholes de azúcar y sacáridos (tales como sorbitol, manosa, glucosa, trehalosa, maltosa), también se pueden utilizar proteínas (como albúmina), aminoácidos (como lisina, glicina) y agentes orgánicos (como PEG y Tween 80) como agentes estabilizadores. La concentración adecuada del agente estabilizador en la solución que contiene IgG, depende del agente específico empleado, como se ha descrito previamente.

La solución de IgG purificada se ajusta, si es necesario, con el fin de obtener una solución estable e isotónica. La expresión "solución isotónica" significa que la solución tiene la misma presión osmótica que el plasma. Como se ha mencionado anteriormente, la fuerza iónica es marcadamente inferior en el producto inmunoglobulínico de la invención en forma de formulación líquida, que en el plasma. Por esta razón, se prefiere utilizar monosacáridos o disacáridos para incrementar la osmolaridad de la solución, puesto que éstos no afectan a la fuerza iónica. En una realización preferida de la presente invención, se añade maltosa a una concentración que asegure que la solución sea isotónica y, al mismo tiempo, la maltosa actúa como agente estabilizador de inmunoglobulinas. Esto se realiza preferentemente añadiendo maltosa hasta tener una concentración final dentro del intervalo de aproximadamente 5 a 15% (p/v), preferentemente 10% (p/v); alternativamente, se pueden utilizar otros sacáridos tales como manosa y glucosa.

Las condiciones finales preferidas para el producto inmunoglobulínico son un compromiso entre estabilidad y condiciones fisiológicamente aceptables, con respecto, por ejemplo, al pH, la fuerza iónica y la tonicidad. Además, el producto inmunoglobulínico debe cumplir con los requerimientos de pruebas de control de calidad, tal como se especifican en la Monografía nº 918, Ph. Eur., 1997.

Las principales ventajas del producto obtenible por el método de la invención, son que, cuando se formula como una preparación líquida, el producto es una combinación de un líquido, un producto listo para usar el cual, al mismo tiempo, es muy estable, está altamente purificado, tiene una distribución de subclases de IgG en gran parte normal y tiene un contenido en IgA extremadamente bajo, así como un bajo contenido en IgM, y conserva la actividad de anticuerpo y la actividad biológica, lo cual se demuestra por la función de Fc.

Además, no contiene esencialmente agregados de inmunoglobulinas y/u otras proteínas plasmáticas, medidas como polímeros mayores que dímeros y tiene una actividad anticomplementaria baja, y tiene un contenido muy elevado en monómeros y dímeros de IgG. La IgG monomérica constituye al menos el 90%, lo cual se considera ideal. Debido a la estabilidad elevada, es posible evitar la adición de otros agentes estabilizadores, tales como albúmina, glicina, detergente o PEG. Finalmente, el producto es seguro contra virus, ya que el procedimiento comprende etapas bien definidas y validadas de reducción de virus, con el fin de eliminar y/o inactivar tanto virus con envuelta lipídica como virus sin envuelta lipídica.

El objetivo de validar una etapa de producción como una etapa de reducción de virus, es proporcionar una evidencia de que el procedimiento de producción inactivará/eliminará eficazmente los virus, de los cuales se sabe que contaminan los materiales de partida o que posiblemente podrían hacerlo con eficacia. Los estudios de validación implican

la adición deliberada de un virus antes de las etapas de producción que se van a validar y medir el grado de su eliminación/inactivación después de la etapa o etapas de producción. Las restricciones de las Buenas Prácticas de Fabricación evitan la introducción deliberada de cualquier virus en las instalaciones de producción. Por lo tanto, la validación se debe realizar en un laboratorio separado, equipado para trabajo con virus en una versión a escala reducida de la etapa de producción y debe estar realizada por personal con experiencia en virus, junto con ingenieros de producción. La cantidad de virus añadida al material de partida para la etapa de producción que se va a validar, debe ser lo más elevada posible con el fin de determinar la capacidad de la etapa de producción para inactivar/eliminar virus adecuadamente. Sin embargo, el inóculo de virus deberá ser añadido de tal manera que la composición del material de producción no se altere significativamente. Preferentemente, el volumen del inóculo de virus será igual o menor que el 10%.

Se deberán llevar a cabo ensayos de infectividad cuantitativa, según los fundamentos de BPL y pueden implicar la formación de placas, la detección de otros efectos citopáticos tales como la formación de sincitios o focos y la titulación de punto final (p. ej., ensayos de DICT<sub>50</sub>), la detección de la síntesis de antígenos víricos u otros métodos. El método debe tener una sensibilidad y una reproducibilidad adecuadas y se deberá realizar con suficientes replicados y testigos para asegurar una exactitud estadística adecuada de los resultados.

Típicamente, una etapa del procedimiento se provoca con 6 logaritmos de virus y si se logra una reducción en el orden de 4 logaritmos o más, estos es indicativo de que la prueba particular investigada tiene un efecto eliminador de virus. De manera similar, una reducción en el orden de 4,5 logaritmos, 5 logaritmos o incluso 5,5 logaritmos, es indicativa de que de la prueba particular que se está investigando tiene un efecto eliminador de virus y la etapa se puede clasificar como una etapa de reducción de virus validada.

Los estudios de validación para virus se deben llevar a cabo con virus que se asemejen tanto como sea posible a los que pueden contaminar el producto y, en segundo lugar, que representen una gama lo más amplia posible de propiedades fisicoquímicas, con el fin de someter a ensayo la capacidad del sistema para eliminar virus en general.

Los estudios de validación para virus se deben llevar a cabo según la nota del CPMP para la directriz sobre Estudios de Validación para Virus: el diseño, la contribución y la interpretación de estudios de validación de la inactivación y eliminación de virus (CPMP/BWP/268/95) y la nota para la directriz sobre Productos Medicinales Derivados del Plasma (CPMP/BWP/269/95).

Los estudios de validación del presente procedimiento se presentan en el Ejemplo 5.

El producto de la invención tiene una pureza mayor del 98%. El alto grado de pureza se debe entre otras cosas, al hecho de que el producto de la invención se obtiene mediante al menos una etapa, preferentemente dos etapas cromatográficas de intercambio aniónico y de intercambio catiónico, opcionalmente conectadas en serie. Es de destacar en este contexto que ha sido posible obtener un alto rendimiento a pesar del número de etapas del procedimiento empleadas, en una escala de producción de al menos 3,5 g de proteína de IgG por kg de plasma congelado fresco.

Los estudios comparativos que se llevaron a cabo (Ejemplo 2) han mostrado que el producto inmunoglobulínico obtenible por el procedimiento de la invención tiene propiedades funcionales ideales, tales como una gran actividad de unión al antígeno y una función de Fc elevada. El medicamento actualmente preferido, desarrollado por los presentes inventores, es una solución de inmunoglobulina al 5% en peso. Las pruebas de estabilidad han indicado hasta la fecha, estabilidad durante más de un año con almacenamiento a 4°C, es decir, que el producto inmunoglobulínico está desprovisto de formación de agregados o fragmentación de inmunoglobulinas G, pérdida de la actividad biológica deseada o incremento de actividades indeseables, p. ej., actividad anticomplementaria y actividad precalicreína, tal como se midió *in vitro*.

Basándose en la presente invención, es posible obtener un producto de IgG que tiene una pureza mayor del 95%, tal como al menos 96%, o al menos 97%, por ejemplo al menos 98%, preferentemente al menos 99%, más preferiblemente al menos 99,5% de pureza. El producto de IgG debe contener menos de 6 mg de IgA/L, tal como menos de 4 mg de IgA/L, preferentemente menos de 3 mg de IgA/L, más preferiblemente menos de 2 mg de IgA/L.

Debe enfatizarse que otros productos contienen agentes estabilizantes en forma de detergente, PEG o albúmina. En una realización preferida, el producto de la presente invención no contiene ninguno de dichos agentes estabilizantes, en vez de eso, se ha escogido un sacárido bien tolerado.

El producto de la presente invención tiene, como una de sus características, un contenido muy bajo en polímeros y agregados. En una realización preferida, el producto de la presente invención contiene menos de 1,5% en polímeros y agregados, tal como menos del 1%, p. ej., menos de 0,5% o menos de 0,25% en polímeros y agregados. El contenido en monómeros y dímeros de IgG es al menos el 98,5% o 99%. El contenido en IgG monomérica es de al menos 90% en el producto.

Los ensayos han mostrado un efecto clínico del producto de la presente invención, comparable al de productos IGIV registrados. El producto ha sido bien tolerado por los pacientes y el tiempo de recambio de las inmunoglobulinas en circulación se ha determinado que es de cuatro semanas. En los presentes ensayos, el efecto inmunomodulador de

IGIV, SSI ha mostrado ser convincente (los datos se presentan en el Ejemplo 3).

Las indicaciones de IGIV son hipo/agammaglobulinemia primaria que incluye la inmunodeficiencia variable común, el síndrome de Wiskott-Aldrich y la inmunodeficiencia combinada grave (IDCG), hipo/agammaglobulinemia secundaria en pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) y mieloma múltiple, niños con SIDA e infecciones bacterianas, púrpura trombocitopénica idiopática crónica (PTI), trasplante alogénico de médula ósea (TMO), enfermedad de Kawasaki y síndrome de Guillan-Barré. Neurología: polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), neuropatía motora multifocal, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Eaton-Lambert, neuritis óptica, epilepsia.

Ginecología: aborto habitual, síndrome antifosfolípídico primario.

Reumatología: artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, escleroderma sistémico, vasculitis, granulomatosis de Wegner, síndrome de Sjögren, artritis reumatoide juvenil.

Hematología: neutropenia autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, neutropenia.

Gastrointestinal: enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad celíaca.

Otros: asma, síndrome de choque séptico, síndrome de fatiga crónica, psoriasis, síndrome de choque tóxico, diabetes, sinusitis, cardiomiopatía dilatada, endocarditis, aterosclerosis, adultos con SIDA e infecciones bacterianas.

Aparte de las indicaciones mencionadas para el tratamiento con productos IGIV, varias enfermedades autoinmunitarias graves que responden generalmente a la terapia con corticosteroides e inmunosupresores, están consideradas como trastornos diana para la terapia con el producto de la presente invención. Entre éstas se encuentran varias enfermedades neurológicas, tales como polirradiculitis y algunas polineuropatías periféricas mediadas por el sistema inmune, pero también algunos trastornos reumáticos inflamatorios crónicos y trastornos vasculares tales como vasculitis sistémica que implica vasos pequeños, polimiositis y otras.

Un modo diferente de acción del producto de la presente invención puede ser la eliminación de antígenos infecciosos en infecciones crónicas y un incremento del metabolismo de IgG.

La invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitantes.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Etapas del procedimiento en la purificación de inmunoglobulina (con excepción de la etapa 5, todas las etapas se llevan a cabo a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ )

#### Etapas 1: Preparación de pasta de la fracción II + III de Cohn:

La pasta de la fracción II + III de Cohn se prepara a partir de plasma humano por el método de fraccionamiento de Cohn convencional (Cohn E., et al., (1946) J Am Chem Soc, 459-475) esencialmente tal como fue modificado por Kistler-Nitschmann (Kistler P y Nitschmann HS, (1952), Vox Sang, 7, 414-424). La precipitación con etanol se inicia después de que el crioprecipitado ha sido eliminado y, si se desea, después de la adsorción de ciertas proteínas plasmáticas (tales como el factor IX y la antitrombina), por ejemplo, sobre un material de intercambio iónico y/o una matriz de Heparina Sepharose®.

Las condiciones exactas (pH, concentración de etanol, temperatura, concentración de proteína) para obtener la pasta de la fracción II-III aparecen en la figura de la página 266 de Hams JR (compilador), Blood Separation and Plasma Fractionation, Wiley-Liss, Nueva York, 1991. La pasta se aísla en un filtro prensa añadiendo un auxiliar de filtración antes de la filtración.

#### Etapas 2: Extracción de inmunoglobulinas a partir de la pasta de la fracción II + III de Cohn:

A partir de 140 kg de pasta de la fracción II + III que incluye 30 kg de auxiliar de filtración (Schenk, Alemania) (correspondiente a un volumen inicial de plasma de aproximadamente 1150 kg), la extracción se realiza añadiendo primero 525 kg de tampón de fosfato/acetato sódico 2,33 mM, pH 4,0, con agitación lenta durante aproximadamente 1,5 horas, seguido por dos adiciones consecutivas de 350 kg de agua inyectable (AI) con agitación durante 1,5 horas después de cada adición. Finalmente, se añaden aproximadamente 280 kg de fosfato/acetato sódico 21,5 mM, pH 7,0, ajustando de esta manera el pH de la suspensión a 5,4.

La suspensión se filtra a través de un filtro de profundidad (C-150AF, Schenk, Alemania). El material filtrado contiene, entre otras proteínas, las inmunoglobulinas.

#### Etapas 3: Precipitación de agregados proteicos y eliminación de virus mediante PEG 6000:

Se añade PEG 6000 (Merck, Alemania) al material filtrado de la etapa 2, hasta tener una concentración final de 6% en peso. Después de precipitar durante 4 horas, la suspensión de PEG se centrifuga hasta la claridad en una centrifuga de flujo continuo (Westfalia BKA28, Alemania) y se filtra en profundidad (50LA y 90LA, Cuno, Francia) y subsecuentemente se esteriliza por filtración a través de un filtro de 0,22 µm (Durapore, Millipore, EE.UU.). El material sobrenadante filtrado de PEG se ajusta con un tampón añadiendo una parte de tampón de acetato sódico 0,45 M, pH 5,7, a 29 partes de material sobrenadante, para alcanzar un pH de 5,7.

Etapa 4: Purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico y catiónico en serie (I):

Se cargan dos columnas cromatográficas con 56 L de DEAE Sepharose FF® (Pharmacia Biotech, Suecia) y 56 L de CM Sepharose FF® (Pharmacia Biotech, Suecia), respectivamente. Las columnas se conectan en serie, de modo que el flujo líquido pase primero a través de la resina de DEAE Sepharose y, subsecuentemente, a través de la resina de CM Sepharose. Las resinas de las columnas se equilibran con tampón de acetato sódico 15 mM, pH 5,7. Después, se aplica la solución de la etapa 3 a las dos columnas en serie.

Durante la cromatografía de intercambio iónico, la mayoría de las proteínas contaminantes en la solución aplicada se unen a la resina de DEAE Sepharose. Aunque la IgG pasa a través sin unirse a la resina de DEAE Sepharose, la IgG se une a la resina de CM Sepharose cuando la solución migra a través de ella. Después de aplicar la solución y lavar con un volumen de columna de tampón de equilibrado, la columna DEAE se desconecta de la columna CM. Después, la columna CM se lava con tres volúmenes de columna de tampón de acetato sódico 15 mM, pH 5,4 y después la IgG se eluye con un gradiente de NaCl de 125 mM a 350 mM, acetato sódico 15 mM, pH 5,4. La fracción de IgG eluida se recoge en sorbitol hasta tener una concentración final de 2,5% en peso.

Etapa 5: Tratamiento con disolvente/detergente (S/D) de la fracción de IgG:

La fracción de IgG eluida se concentra y se desaliniza por ultrafiltración/diafiltración hasta tener una concentración de aproximadamente 50 g de IgG/litro. La membrana empleada es una membrana de polisulfona, con corte de peso nominal de 30 kDa (Millipore). La diafiltración se realiza frente a un tampón de acetato sódico 15 mM, pH 5,4, que contiene 2,5% en peso de sorbitol y continúa hasta que la conductividad es menor de 1,4 mS/cm. El contenido en IgG de la solución se determina espectrofotométricamente, midiendo a 280 nm (A<sub>280</sub>). La concentración de sorbitol se ajusta a 10% en peso y la solución se filtra a través de un filtro de 0,45 µm (Pall Corporation, GB). A continuación, se añaden Tween 80 y TNBP hasta tener una concentración final de 1% y 0,3% en peso, respectivamente, para el posterior tratamiento con S/D. El tratamiento con S/D se realiza durante al menos 6 horas a 25°C.

Etapa 6: Eliminación de S/D mediante cromatografía de intercambio iónico (II):

Dos columnas conectadas en serie, cargadas con 28 L de DEAE y 56 L de CM Sepharose FF, respectivamente, se equilibran con acetato sódico 15 mM, pH 5,4. La fracción de IgG tratada con S/D de la etapa 5 se diluye con 5 partes de tampón acetato 15 mM, pH 5,4, se filtra a través de un filtro de profundidad (Cuno 90 LA) y posteriormente se esteriliza por filtración (Sartobran, Sartorius) y se aplica a las dos columnas conectadas en serie. La cromatografía de intercambio iónico y la subsecuente elución de IgG a partir de la columna CM, se llevan a cabo esencialmente de la manera descrita en la etapa 4, excepto que la columna CM se lava a fondo con 6 volúmenes de columna de tampón para eliminar agentes procedentes del tratamiento con S/D. La fracción de IgG eluida se recoge en maltosa (Merck, Alemania) hasta tener una concentración final de 2,5% en peso.

Etapa 7: Concentración final y formulación de la inmunoglobulina para uso intravenoso:

La fracción de IgG eluida a partir de la etapa 6 se somete a ultrafiltración y se desaliniza por diafiltración frente a acetato sódico 7,5 mM, que contiene 2,5% en peso de maltosa, pH 5,4, hasta tener una conductividad final menor de 1 mS/cm. La membrana empleada es una membrana de polisulfona con un corte de peso nominal de 100 kDa, lo que permite que las proteínas de menor peso molecular sean eliminadas. La concentración final de IgG se ajusta a 50 g/litro y la maltosa se ajusta hasta tener una concentración final de 10% (p/v). La preparación final ajustada con maltosa se filtra a través de un filtro estéril (Sartopure GF 2, Sartorius) y se llena en frascos asépticamente.

**Ejemplo 2**

Resultados de un estudio analítico de un producto obtenido por el presente procedimiento, en comparación con otros productos IGIV

	Gammonativ	Octagam	Gammagard	IGIV, SSI
	líoofilizado	líquido	líoofilizado	líquido
Pureza	45,4% <sup>1</sup>	99,1%	94,6% <sup>1</sup>	99,8%
Albúmina	50 mg/ml <sup>2</sup>	cantidades pequeñas	3 mg/ml <sup>2</sup>	no detectable
Contenido en monómeros+dímeros	g8,3% <sup>3</sup>	96,8%	97,6% <sup>3</sup>	99,3%

## ES 2 421 736 T3

	Gammonativ	Octagam	Gammagard	IGIV, SSI
1: sin corrección para bilaerHSA; 2: declarado por el productor; 3: corregido para el pico de HSA;				
	Gammonativ	Octagam	Gammagard	IGIV, SSI
polímeros+agregados	0,8% <sup>3</sup>	1,6%	<0,1% <sup>3</sup>	<0,1%
AAC	26%	30%	34%	32%
APK	<8,5 IE/ml	<8,5 IE/ml	<8,5 IE/ml	<8,5 IE/ml
Hemaglutinina, solución al 3%				
anti-A > 1:2	negativo	negativo	negativo	negativo
anti-B > 1:2	negativo	negativo	negativo	negativo
Función de Fc	169%	121%	132%	178%
Distribución por subclases				
IgG1	60,0%	61,9%	67,7%	56,6%
IgG2	35,8%	33,1%	27,2%	39,4%
IgG3	3,5%	3,6%	4,4%	2,6%
IgG4	0,7%	1,4%	0,6%	1,5%
IgA	2,96 mg/l	54,7 mg/l	0,85 mg/l	1,36 mg/l
IgM	0,28 mg/l	39,1 mg/l	0,99 mg/l	0,16 mg/l
Tween 80	<20 ppm	<20 ppm	no determinado	<20 ppm
TNBP	2,0 ppm	1,5 ppm	1,5 ppm	1,5 ppm
PEG	0,01 mg/ml	0,01 mg/ml	1,6 mg/ml <sup>4</sup>	0,02 mg/ml
pH	6,7	5,7	6,7	5,6
Concentración de proteína total	97 g/l	45 g/l	50 g/l	51 g/l
Maltosa o glucosa	20 mg/ml	92 mg/ml	15 mg/ml	88 mg/ml
3: corregido para el pico de HSA; 4: usado como estabilizador				

### Pureza (composición proteica)

- 5 Los requerimientos de pureza de la Farmacopea para una preparación de IGIV son de al menos 95% de IgG; es decir, no más de 5% de proteínas contaminantes que no son IgG. La pureza se considera muy importante por varias razones. Desde un punto de vista racional, solo la proteína que es portadora de la función deseada debe estar presente, y otras proteínas contaminantes pueden ser potencialmente peligrosas, p. ej., por causar efectos adversos indeseables y/o influir sobre la estabilidad del producto.
- 10 La pureza se puede analizar, por ejemplo, mediante una técnica electroforética, tal y como se describe detalladamente en la Farmacopea Europea, Ph. Eur., 1997, páginas 964-965, en donde las proteínas se separan en un gel de acetato de celulosa. Sin embargo, a efectos prácticos se utiliza un gel de agarosa. Después de la electroforesis, el gel se fija, se seca y se tiñe. Finalmente, las bandas de proteína se controlan mediante barrido. Se desprende de la tabla anterior que el producto de la invención es prácticamente puro (99,8%).
- 15 Albúmina  
El contenido en albúmina se analizó mediante inmunolectroforesis cruzada, esencialmente de la manera descrita por C.B. Laurell (Anal Biochem (1965), 10, 358-361). Se analizaron 5 µL del producto frente a anticuerpos anti-albúmina humana (DAKO A/S, Dinamarca, nº A0001 (1/100)). Debido a la alta pureza, la albúmina no fue detectable en el producto analizado de la invención.
- 20 Contenido en monómeros y dímeros de IgG

5 El contenido en monómeros y dímeros de IgG se puede analizar por cromatografía de permeación en gel y se vigila a partir del cromatograma integrando las áreas de los picos de monómero y de dímero, cf. Ph. Eur. Los resultados de los diversos análisis se enumeran en la tabla anterior, de los que se desprende que la suma de las áreas de monómero + dímero constituye el 99,3% del área total del cromatograma (partiendo de esto, la IgG monomérica constituye el 92%) para el producto de la invención.

#### Contenido en polímeros y agregados

10 La presencia de polímeros y agregados se sabe que causa graves efectos adversos, frecuentemente síntomas similares a la influenza. Debido al grado de pureza tan elevado, alcanzado por el procedimiento de producción más bien suave, el producto inmunoglobulínico obtenible por el procedimiento de la invención está sustancialmente exento de polímeros y agregados.

Los polímeros se pueden analizar mediante cromatografía de permeación en gel y cualquier pico de proteína con tiempos de retención más cortos que el tiempo de retención para la IgG dimerica, se considera polimérico, de la manera descrita en la Ph. Eur.

15 Según la Ph. Eur. y otras directrices, el contenido en agregados proteicos debe ser preferentemente menor del 3%. El producto del presente procedimiento contiene cantidades no medibles de agregados y, por lo tanto, se considera que tiene menos del 0,1% en polímeros y agregados.

#### Actividad anticomplementaria (AAC) y actividad activadora de precalicreína (APK)

La AAC y APK se midieron de la manera descrita en la Ph. Eur.

20 La AAC debe ser preferentemente lo más baja posible. Según la Ph. Eur., el consumo de complemento debe ser menor o igual al 50%. El consumo de complemento de la muestra medida del producto de la invención, es de aproximadamente 30%, es decir, es comparable al de los otros productos analizados. Debe observarse que la presencia de albúmina tiende a suprimir el consumo de complemento (observación del inventor).

25 La APK, si está presente en cantidades sustanciales, es esencial para el efecto adverso hipotensor del producto. Por lo tanto, la APK debe ser preferentemente lo más baja posible en un producto inmunoglobulínico. Según la Ph. Eur., debe ser <35 UI/ml cuando se mide como se describe en la Farmacopea Europea. La APK del producto de la invención, así como la de los demás productos analizados, es menor que el nivel de cuantificación del método, es decir, po debajo de 8,5 EI/ml.

#### Hemaglutininas

30 La fracción de IgM de las inmunoglobulinas plasmáticas comprende las hemaglutininas; es decir, anticuerpos contra antígenos de los grupos sanguíneos A y B. La presencia de tales anticuerpos puede causar efectos adversos no deseados debido a la posibilidad de reacción hemolítica si el receptor es portador de los tipos sanguíneos A y/o B.

Según los requerimientos de la Farmacopea, el contenido en hemaglutininas debe ser menor que el que causa aglutinación de eritrocitos A/B en una dilución 1:64 del producto inmunoglobulínico. Todos los productos analizados cumplen con este requerimiento.

#### Función de Fc

40 La conservación de las actividades de unión al antígeno es esencial para las funciones biológicas de las IGIV. Esto también es válido para las actividades inmunomoduladoras. Por otro lado, la conservación de la función de Fc es esencial para el efecto de las IGIV sobre varias células fagocíticas y la activación del sistema de complemento. La función de Fc se puede demostrar utilizando varias técnicas, pero una metodología aceptada y descrita en la Ph. Eur., mide el potencial activador del complemento de los anticuerpos en la preparación contra un antígeno de la rubéola. La actividad se compara con la de una preparación biológica de referencia (BRP, Ph. Eur.) de inmunoglobulinas, establecida como 100%. El producto cumple la prueba si la actividad relativa es superior al 60% con respecto a la preparación de referencia. Parece que la función de Fc del producto de la invención está muy bien conservada, particularmente en comparación con los otros productos líquidos analizados, muy probablemente debido al procedimiento de purificación suave.

#### Distribución de las subclases

50 La distribución de las subclases de IgG se mide por un método de inmunodifusión de Mancini convencional, esencialmente tal y como describe A. Ingild (Scand J Immunol, (1983), 17, 41). Las concentraciones se determinan utilizando un suero de referencia de la OMS (67/97). Se requiere que la distribución de las subclases esté dentro del intervalo de plasma humano normal con la mediana de las concentraciones en el intervalo de 3,7-10,2 g de IgG1/L de suero, 1,1- 5,9 g de IgG2/L de suero, 0,15-1,3 g de IgG3/L de suero y 0,06-1,9 g de IgG4/L de suero (R. Djurup et al. Scand J. Clin Lab Invest 48, 77-83). Por lo tanto, la distribución de las subclases de todos los productos es aceptable.

Contenido en IgA

Se sabe que la presencia de IgA causa potencialmente una sensibilización en receptores con falta de IgA. Si un paciente con deficiencia en IgA recibe una preparación de inmunoglobulina que contiene IgA, la IgA se puede considerar como un antígeno extraño y el resultado puede ser la inducción de anticuerpos contra IgA en el receptor. La siguiente vez que se infunda una preparación que contiene IgA al paciente, se puede provocar una reacción anafiláctica. Por lo tanto, es esencial que una preparación inmunoglobulínica contenga la menor cantidad posible de IgA. La IgA en un producto IGIV se puede vigilar utilizando una técnica de ELISA, p. ej., en la que se utiliza un anticuerpo policlonal anti-IgA para capturar la IgA y se emplea una anti-IgA marcada para la detección de IgA unida. Se construyen patrones mediante diluciones de un calibrador (nº X908, DAKO A/S, Dinamarca) con un contenido declarado en IgA.

El producto del procedimiento descrito en el Ejemplo 1 contiene menos de 2 mg de IgA/L, lo que es un contenido en IgA considerablemente menor que el del otro producto líquido analizado. Las similitudes fisicoquímicas entre IgG e IgA dificultan la separación de estas inmunoglobulinas durante un procedimiento de purificación. Sin embargo, las dos etapas cromatográficas de intercambio aniónico/catiónico en el procedimiento, reducen el contenido en IgA hasta un nivel muy bajo.

Contenido en IgM

En una preparación de Ig, la IgM se puede vigilar utilizando una técnica de ELISA, p. ej., cuando se utiliza un anticuerpo policlonal anti-IgM para capturar IgM, y se emplea una anti-IgM marcada para la detección. Se construyen patrones mediante diluciones de un calibrador (nº X908, DAKO A/S, Dinamarca) con un contenido declarado en IgM. En la tabla puede observarse que el contenido en IgM del producto de la invención es muy bajo y es marcadamente menor que el del otro producto líquido.

Tween 80, TNBP y PEG

Tween 80, TNBP y PEG se miden por procedimientos convencionales. En general, el contenido en estos aditivos debe ser lo más bajo posible.

pH

El pH de los productos líquidos analizados es ácido, pH 5,6-5,7, mientras que el de los productos liofilizados analizados es neutro después de la disolución, con un pH de 6,7.

Concentración total de proteínas

Según la Ph. Eur., la concentración de proteínas debe ser de al menos 50 g/L  $\pm$  10%; todos los productos cumplen con este requisito. La concentración de proteínas se mide por el método de Kjeldahl.

Agentes estabilizantes de maltosa y glucosa

Los sacáridos se utilizan comúnmente como agentes estabilizantes de productos inmunoglobulínicos, tienen buenas propiedades estabilizantes y se excretan rápidamente. El contenido en maltosa, sacarosa y glucosa se determina utilizando un kit comercial (Boehringer Mannheim, Alemania) con maltosa como referencia.

Parece ser que los dos productos liofilizados estabilizados con albúmina y albúmina así como PEG, respectivamente, también contienen un agente estabilizante sacárido en concentraciones desde aproximadamente 15 mg/ml a 20 mg/ml. El producto de la invención y el otro producto líquido están estabilizados de manera muy similar, es decir, con aproximadamente 9%, 88 mg/ml y 92 mg/ml de maltosa. En relación con el contenido en polímeros y agregados como parámetro de estabilidad, el producto de la invención tiene una mayor estabilidad que el otro producto líquido analizado, aunque sus formulaciones parecen ser muy similares.

**Ejemplo 3**

## Resultados de los ensayos clínicos

Los ensayos clínicos del producto de la presente invención, también referido como IGIV, SSI, se llevan a cabo según las directrices ICH y CPMP/388/95.

Se examinó la farmacocinética, el efecto y la seguridad. Los ensayos clínicos hasta la fecha han incluido cuatro grupos de pacientes: pacientes con síndrome de inmunodeficiencia primaria (15 pacientes), con síndrome de inmunodeficiencia secundaria (6 pacientes), con púrpura trombocitopénica idiopática (15 pacientes) y pacientes con polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (5 pacientes).

Los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia primaria o secundaria fueron tratados con 0,2-0,4 g/kg, con intervalos de 2 a 5 semanas. Los pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática fueron tratados con 400 mg/kg al día durante cinco días, o con 1000 mg/kg al día durante dos días.



Por medidas de seguridad, se determinaron las transaminasas séricas, la creatinina sérica y los marcadores víricos en todos los pacientes. Cinco pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática fueron sometidos a un seguimiento con marcadores víricos de seguridad, renales y hepáticos durante un total de hasta 24 semanas.

Farmacocinética

5 La  $T_{1/2}$  se midió a 30,5 días (mediana). Esto está de acuerdo con los resultados de otros medicamentos de IGIV.

Efecto

10 Para pacientes con síndrome de inmunodeficiencia primaria y secundaria, los días perdidos por enfermedad, hospitalizaciones, días bajo terapia con antibióticos, días con fiebre y el número de neumonías, se registraron retrospectivamente durante un periodo de 6 meses, durante el cual los pacientes habían sido tratados con otros medicamentos de IGIV registrados. En los 6 meses siguientes, durante los cuales los pacientes fueron tratados con inmunoglobulina SSI, líquida, se registraron los mismos parámetros.

La conclusión es que la inmunoglobulina SSI, líquida, es tan eficaz como las otras composiciones de IGIV para la profilaxis/prevención de infecciones en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia primaria y secundaria.

15 En el 80% de los pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática, el número de plaquetas se elevó desde  $<30 \times 10^9/L$  antes del tratamiento con inmunoglobulina SSI líquida, a  $\geq 50 \times 10^9/L$  después del tratamiento. El incremento en el recuento de plaquetas y la duración de la remisión en los pacientes individuales estaban al mismo nivel que después de la administración de la misma dosis de otros medicamentos de IGIV, en los casos en los que fue posible la comparación. Un paciente que recibió IGIV por primera vez, era refractario a la prueba del fármaco. Tal reacción frente a IGIV no es poco frecuente y, por lo tanto, no es sorprendente. Los detalles de la subida de plaquetas y la duración de la subida están en estudio.

20 La conclusión es que la inmunoglobulina SSI líquida es tan eficaz como los demás medicamentos de IGIV en el tratamiento del bajo recuento de plaquetas en pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática.

25 De acuerdo con los médicos y los pacientes que padecen polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, la IGIV SSI ha mostrado una eficacia idéntica a la IGIV administrada antes del ensayo. La IGIV SSI fue tolerada por los pacientes igual de bien que como fueron tolerados otros productos de IGIV por los pacientes.

Seguridad

30 Aparte de un evento adverso grave, esplenectomía, de la que determinó el investigador que no tenía relación con el fármaco del ensayo, solo se han registrado eventos adversos menores. Estos efectos adversos fueron principalmente dolor de cabeza con fiebre y vómito. Hasta la fecha no ha habido informes de signos vitales anormales durante las infusiones de IGIV SSI. No se han registrado seroconversiones víricas. No ha habido informes de daños hepáticos o renales, ni casos de choques anafilácticos.

Los estudios clínicos muestran que la inmunoglobulina SSI líquida es bien tolerada. La frecuencia de los efectos secundarios, el grado y la naturaleza de los mismos no se desvía de la experiencia con otros medicamentos de IGIV.

**Ejemplo 4**

35 Resultados de estudios de estabilidad para IGIV líquida

40 Con el fin de someter a ensayo si el producto de IGIV líquida es estable en el tiempo, se realizó un estudio de la estabilidad en Condiciones Reales y Tiempo Real. Un total de 4 lotes consecutivos (250 ml de cada muestra) del producto de IGIV participaron en el estudio y se almacenaron a una temperatura entre 2°C - 8°C, durante al menos 12 meses. Las muestras de los cuatro lotes fueron analizadas en el momento cero, a los 6 meses y a los 12 meses de almacenamiento. Los resultados del estudio se presentan a continuación en forma de promedio de los 4 lotes.

	0 meses de almacenamiento	6 meses de almacenamiento	12 meses de almacenamiento
Apariencia	Ligeramente opalescente e incoloro	Ligeramente opalescente e incoloro	Ligeramente opalescente e incoloro
Contenido en monómeros+dímeros	100%	99,6%	99,5%
polímeros+agregados	<0,1 %	<0,1 %	<0,1 %

	0 meses de almacenamiento	6 meses de almacenamiento	12 meses de almacenamiento
--	---------------------------	---------------------------	----------------------------

AAC	39,7%	38,2%	37,3%
APK	<8,5 IE/ml	<8,5 IE/ml	<8,5 IE/ml
Función de Fc	107%	113%	111%
Distribución por subclases			
IgG1	59,2%	57,7%	57,1%
IgG2	36,4%	38,1 %	38,6%
IgG3	2,7%	2,6%	2,5%
	0 meses de almacenamiento	6 meses de almacenamiento	12 meses de almacenamiento
Distribución por subclases			
IgG4	1,8%	1,6%	1,7%
pH	5,5	5,5	5,5
Composición proteica (% de IgG)	99,8%	99,7%	99,1%
Concentración proteica total	48,8 g/l	48,3 g/l	49,2 g/l
Osmolaridad	348 mOsm/kg	347 mOsm/kg	350 mOsm/kg

Todas las pruebas mencionadas anteriormente se llevaron a cabo según la Ph. Eur. y tal y como se ha descrito en el Ejemplo 2.

5 La observación de que el contenido en monómeros y dímeros es constante durante un periodo de 12 meses, indica que no se forman polímeros en la muestra. La presencia de polímeros de inmunoglobulina se sabe, entre otras cosas, que causa graves efectos adversos, frecuentemente síntomas similares a la influenza. Debido a la muy alta estabilidad del producto inmunoglobulínico obtenible por el procedimiento de la invención, el producto está sustancialmente exento de polímeros y agregados, incluso después de un largo periodo de almacenamiento.

10 No se observó ningún incremento en la AAC con el tiempo, aunque en este estudio de la estabilidad se habían incluido deliberadamente lotes que expresaban una alta AAC. Si se observaba un incremento en AAC, podría indicar que se estaban formando agregados durante el almacenamiento. Por lo tanto, la AAC constante en el tiempo indica que no se están formando agregados.

15 Los resultados indican además que no se desarrolló una actividad activadora de precalicreína durante el almacenamiento del producto, ya que la actividad APK no se incrementó. Sin embargo, debe observarse que los valores medidos están por debajo del nivel de cuantificación mínimo.

20 La medición de la función de Fc indica que la presencia de IgG funcional intacta se mantiene durante el almacenamiento. Por ello, no hay proteasas presentes en las muestras, ya que éstas habrían degradado las proteínas y por lo tanto, disminuido la función de Fc. No ha habido tampoco desnaturalización de moléculas IgG, ya que esto habría disminuido la actividad de unión al antígeno.

25 Como es sabido por los técnicos en la materia, podría haber diferencias en la estabilidad de las diversas subclases de IgG. Como puede observarse a partir de los presentes resultados, todas las subclases se mantienen durante el almacenamiento, indicando que el producto es estable. Esto es respaldado adicionalmente por el hallazgo de que la composición proteica de IgG en las muestras, con aproximadamente la misma concentración total de proteínas, casi no se altera en el tiempo, indicando que no existe una degradación general de la IgG, es decir, el producto de la presente invención es estable y se puede almacenar durante al menos 12 meses a 2-8°C sin tener cambios significativos de las características y por esto se demuestra su eficacia y su seguridad.

### Ejemplo 5

Etapas validadas de reducción de virus en el presente procedimiento de IGIV

30 Eliminación de virus mediante una etapa de partición

Precipitación de los virus presentes en la solución de inmunoglobulina mediante polietilenglicol.

Se han realizado estudios de validación de virus, empleando dos virus pequeños sin envuelta, obteniéndose las siguientes reducciones víricas:

eliminación de 6,3 log<sub>10</sub> del virus de la hepatitis A (VHA)

eliminación de 7,2 log<sub>10</sub> del virus de la polio.

Se realizaron estudios de validación de virus empleando dos virus con envuelta, obteniéndose las siguientes reducciones víricas:

5           eliminación de 7,6 log<sub>10</sub> de VIH

          eliminación de 7,5 log<sub>10</sub> de VDVB

Inactivación de virus mediante una etapa de tratamiento con S/D

Tratamiento de la solución inmunoglobulínica con 1% de Tween 80 + 0,3% de TNBP, a 25°C durante ≥ 6 horas.

10          Se realizaron estudios de validación de virus empleando 4 virus con envuelta, obteniéndose las siguientes reducciones de virus:

          inactivación de 7,4 log<sub>10</sub> de VIH

          inactivación de 5,3 log<sub>10</sub> de virus Sindbis

          inactivación de 4,1 log<sub>10</sub> de VDVB

          inactivación de 5,1 log<sub>10</sub> de VSR

15          Se realizaron un total de 8 estudios de validación en dos etapas diferentes en el procedimiento de la presente invención. La etapa de precipitación con PEG se validó como una etapa de eliminación de virus empleando cuatro virus diferentes, dos virus pequeños sin envuelta, VAH y virus de la polio, y dos virus con envuelta, VIH y VDVB, como modelo para el virus de la hepatitis C. Estos estudios mostraron que los cuatro virus fueron eliminados eficazmente mediante la precipitación con PEG. La etapa de precipitación con PEG se validó, por lo tanto, como una etapa eficaz de eliminación de virus. El tratamiento con S/D se validó empleando cuatro virus con envuelta diferentes. A partir de los datos de los estudios de validación, parece que la etapa de tratamiento con S/D inactivaba eficazmente los cuatro virus. Por lo tanto, la etapa de tratamiento con S/D se validó como una etapa eficaz para la inactivación de virus. Ambas etapas de reducción de virus en el procedimiento de IGIV, la eliminación mediante precipitación con PEG y la inactivación mediante el tratamiento con S/D, han sido validadas como eficaces para eliminar e inactivar cuatro virus diferentes cada una. Los factores de reducción acumulativos de VIH y VDVB en el procedimiento son 15 y 11,6, respectivamente. Por ello, el producto del presente procedimiento se puede considerar protegido contra virus.

20

25

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para purificar inmunoglobulina G (IgG) a partir de una fracción proteica plasmática cruda que contiene inmunoglobulina, en donde el procedimiento comprende las etapas de:

5 (a) preparar una suspensión acuosa de la fracción proteica plasmática cruda que contiene inmunoglobulina, de modo que la concentración de IgG en la suspensión acuosa sea de al menos aproximadamente 4 g/l, el pH de la suspensión que contiene inmunoglobulina está dentro del intervalo de 5,1 a 5,7 y la suspensión que contiene inmunoglobulina se filtra adicionalmente mediante filtración en profundidad;

10 (b) añadir un agente precipitante de proteína, sustancialmente no desnaturizante, hidrosoluble a dicha suspensión filtrada de la etapa (a) en una cantidad suficiente para causar la precipitación de una elevada proporción de proteínas no inmunoglobulinas G, inmunoglobulinas agregadas y partículas incluyendo partículas potencialmente infecciosas tales como partículas víricas, sin causar una precipitación sustancial de la inmunoglobulina G monomérica, formando de esta manera una mezcla de precipitado sólido y material sobrenadante líquido; en donde el agente precipitante es PEG 3350, PEG 4000 o PEG 6000 dentro del intervalo de 4 a 10% en peso e incubar desde aproximadamente 2 horas hasta aproximadamente 12 horas a temperatura entre 2°C y 8°C;

15 (c) clarificar y recuperar un material sobrenadante que contiene inmunoglobulina G a partir de la mezcla de la etapa (b); y filtrar en profundidad el material sobrenadante clarificado para eliminar las partículas y agregados de gran tamaño;

20 (d) aplicar el material sobrenadante clarificado que contiene inmunoglobulina G de la etapa (c) a una resina DEAE Sepharose Fast Flow (DEAE) y posteriormente a una resina CM Sepharose Fast Flow (CM), en donde la resina DEAE y la resina CM están conectadas en serie y en donde el tampón utilizado para la cromatografía DEAE y la CM es el mismo tampón, el pH de dicho tampón está en el intervalo de 5,4 a 5,9 y la conductividad está en el intervalo de 1,0 a 1,4 mS/cm, lavar con un volumen de columna de un tampón de lavado y a continuación desconectar las columnas DEAE y CM;

25 (e) eliminar por lavado los contaminantes proteicos y las proteínas precipitadas procedentes de la resina CM de la etapa (d) con un tampón que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para eliminar los contaminantes de la resina sin causar una elución sustancial de la inmunoglobulina G, en donde el tampón tiene un pH entre 5,2 y 5,8;

30 (f) eluir la inmunoglobulina G desde la resina CM de la etapa (e) con un tampón sustancialmente no desnaturizante que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para causar una elución eficaz de la inmunoglobulina G, recuperando de esta manera un eluido que contiene inmunoglobulina G; en donde la elución se realiza como una etapa con gradiente de elución desde aproximadamente 125 mM a aproximadamente 350 mM de cloruro sódico y un pH en el intervalo de 5,2 a 5,8;

35 (g) realizar una diafiltración/ultrafiltración con el eluido que contiene inmunoglobulina G de la etapa (f) para concentrar y/o dializar el eluido hasta que la conductividad de la solución ultrafiltrada se reduzca a un valor inferior a aproximadamente 1,3 mS/cm y en donde el pH se mantiene dentro del intervalo de 4,0 a 6,0, y opcionalmente añadir un agente estabilizante;

(h) realizar una etapa de inactivación de virus, y

40 (i) si se desea, someter la solución purificada que contiene IgG a tratamientos adicionales con el fin de adaptarla a una formulación como producto líquido.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa de inactivación de virus (h) en la reivindicación 1 comprende las etapas de:

45 (a) añadir una cantidad viricida de agente inactivador de virus a la fracción dializada/ultrafiltrada que contiene inmunoglobulina G y opcionalmente estabilizada de la etapa (g) de la reivindicación 1, obteniéndose como resultado una solución sustancialmente protegida contra virus que contiene inmunoglobulina G;

(b) aplicar la solución que contiene inmunoglobulina G de la etapa (a) a una resina de intercambio aniónico y subsecuentemente a una resina de intercambio catiónico;

50 (c) lavar la resina de intercambio catiónico de la etapa (b) con un tampón que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para eliminar por lavado los contaminantes proteicos y el agente inactivador de virus de la resina, sin causar una elución sustancial de la inmunoglobulina G y

(d) eluir la inmunoglobulina G de la resina de intercambio catiónico de la etapa (c) con un tampón sustancialmente no desnaturizante que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para causar una elución eficaz de la inmunoglobulina G, recuperando de esta manera un eluido que contiene inmunoglobulina G.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por someter el eluido que contiene inmunoglobulina G de la etapa (d) de la reivindicación 2 a diafiltración/ultrafiltración para disminuir la fuerza iónica a menos de 1,0 mS/cm y concentrar la inmunoglobulina G de la solución.
- 5 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente añadir un agente estabilizante y/o el ajuste de la osmolaridad.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en donde se añaden alcoholes de azúcar, sacáridos, aminoácidos o agentes orgánicos.
- 10 6. Un producto de inmunoglobulina líquido obtenible por un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, que tiene una concentración de IgG desde aproximadamente 1 a 20% en peso y que tiene las siguientes características:
- a) una pureza mayor del 98%,
  - b) un contenido en monómeros y dímeros de IgG mayor del 98,5%,
  - c) un contenido en IgA inferior a 6 mg de IgA/L y
  - d) un contenido en IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- 15 7. Un producto de inmunoglobulina líquido según la reivindicación 6, que no comprende albúmina como agente estabilizante.
8. Un producto de inmunoglobulina líquido según las reivindicaciones 6 o 7, que contiene menos de 4 mg/L de IgA.
- 20 9. Un producto de inmunoglobulina líquido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que contiene entre 55 y 65% de IgG1, entre 30 y 40% de IgG2, entre 2 y 5% de IgG3 y entre 1 y 4% de IgG4.
10. Un producto de inmunoglobulina líquido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que contiene menos de 1,5% de polímeros y agregados.
11. Un producto de inmunoglobulina líquido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, para administración intravenosa instantánea.
- 25 12. Un producto de inmunoglobulina líquido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde la concentración de IgG es 5%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% o 20% en peso.
13. Un producto de inmunoglobulina líquido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, para uso en medicina.