

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 992**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2004** **E 04742459 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013** **EP 1610819**

54 Título: **Formulación estabilizadora para composiciones de inmunoglobulina G en forma líquida y en forma liofilizada**

30 Prioridad:

09.04.2003 FR 0304388

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

10.10.2013

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANCAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
ZONE D'ACTIVITÉ DE COURTABOEUF, 3,
AVENUE DES TROPIQUES
91940 LES ULIS, FR**

72 Inventor/es:

**BARDAT, ANNIE;
BEGIN, EDITH;
KHANDOUDI, NASSIRAH;
JUST, OLIVIER;
CHTOUROU, SAMI y
SCHMITTHAEUSLER, ROLAND**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 424 992 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

Formulación estabilizadora para composiciones de inmunoglobulina G en forma líquida y en forma liofilizada

La invención se refiere a una formulación estabilizadora, farmacéuticamente aceptable, para la estabilización y la conservación de composiciones de inmunoglobulina G (IgG) bien en forma líquida, o bien en forma liofilizada.

5 Actualmente, se tratan numerosas patologías, por ejemplo de origen autoinmune, mediante concentrados de IgG, lo que ha generado una situación de escasez en Europa y en los Estados Unidos de América a lo largo de estos últimos años.

10 Por ello, existe la necesidad cada vez mayor de producir concentrados de IgG, habitualmente acondicionados en pH ácidos e inyectables por vía intravenosa, a partir, por ejemplo de plasma humano. Con el crecimiento de estas necesidades de IgG, la estabilización de estos concentrados de IgG inyectables por vía intravenosa (IgGIV) para su uso terapéutico y para su conservación bien en forma líquida, o bien en forma liofilizada, reviste una importancia fundamental.

15 Para ello, se sabe que es necesario estabilizar las IgGIV para evitar, en particular, la formación de agregados (oligómeros y polímeros) susceptibles de activar el sistema de complemento con los riesgos asociados de reacciones anafilácticas. Por otra parte, la presencia de dímeros en las IgGIV se ha correlacionado con bajadas de presión arterial *in vivo* (Bleeker, W. K. y otros, Blood, 95, 2000, págs. 1.856-1.861). También pueden producirse otras degradaciones fisicoquímicas durante la conservación de las IgG como, entre otras, la oxidación y la hidrólisis.

20 La estabilización de las formas liofilizadas o líquidas de las IgG precisa, por lo tanto, la adición de compuestos, tradicionalmente seleccionados entre los azúcares y los ácidos aminados, con el fin de obtener no solo unas composiciones de IgG no degradadas adecuadas a un uso terapéutico, sino también unas composiciones de IgG que presentan una estabilidad incrementada en almacenamiento.

25 La estabilización de las formas liofilizadas de composiciones proteínicas y, en particular, de IgG, mediante la adición de estabilizadores específicos, ha sido objeto de muy numerosos estudios. Los que se citan en las publicaciones científicas de M. Pikal, "Freeze-Drying of Proteins, Part 2: Formulation Selection", Biopharm, 3 (9), págs. 26-30 (1990) y de Arakawa y otros, Pharm. Res., 1991, 8 (3), págs. 285-291, muestran que la adición de un excipiente en composiciones proteínicas antes de la liofilización aumenta la estabilidad durante la liofilización y/o la estabilidad del producto liofilizado durante su almacenamiento. Entre estos estabilizadores, algunos son conocidos sin embargo como agentes precipitantes de proteínas superiores a aproximadamente 100 kDa. De este modo, el uso de polietilenoglicol (PEG) 3.000-6.000 es inaceptable en la fase de congelación para la liofilización de composiciones proteínicas correspondientes. Osterberg y otros (Pharm. Res., 1997, 14 (7), págs. 892-898) ha mostrado la eficacia de una mezcla de histidina, de sacarosa, de un tensioactivo no iónico y de cloruro de sodio para la estabilización de las formas liofilizadas del factor VIII recombinante y la adición de PEG no ha mejorado su estabilidad. Por otra parte, Guo y otros (Biomacromol., 2002, 3 (4), págs. 846-849) precisan que la liofilización de la peroxidasa de rábano en presencia de PEG no permite conservar la estructura original de esta. La presencia de PEG no parece, por lo tanto, deseable.

Hay disponibles en el mercado composiciones de IgGIV liofilizadas, por ejemplo bajo los nombres comerciales Polygam™ (American Red Cross), Gammar IV™ (Armour Pharmaceutical Company) y Venoglobulin™ (Alpha) que contienen como estabilizadores glucosa al 2 %, sacarosa al 5 % y D-manitol al 2 % respectivamente.

40 La patente US 5 945 098 describe unas composiciones de IgG estables en almacenamiento que comprende, a título de estabilizadores, uno o varios ácidos aminados, como la glicina, un detergente no iónico, polietileno glicol (PEG) (necesariamente presente en todas estas composiciones) y eventualmente otros compuestos, como la polivinilpirrolidona (PVP), azúcares y sales.

45 La solicitud EP 0 196 761 describe unos compuestos que solo se pueden utilizar como estabilizadores durante la pasteurización de soluciones de IgG. Entre estos, un estabilizador principal es un azúcar (monosacárido, disacárido o azúcar alcohólico), al que se añade un estabilizador secundario que puede ser al menos un ácido aminado neutro, una sal neutra de ácido inorgánico, una sal de ácido carboxílico y un tensioactivo.

50 La solicitud de patente internacional WO 97/04801 describe el efecto estabilizador de formulaciones de anticuerpos monoclonales liofilizados (de tipo inmunoglobulina G y E) que comprende unos excipientes específicos. Entre estos excipientes, la combinación glicina/manitol no se escoge por falta de eficacia frente a otras combinaciones como sacarosa/glicina y sacarosa/manitol.

No obstante, se constata que algunos estabilizadores adecuados para las formas liofilizadas de las IgGIV pueden resultar totalmente ineficaces para las composiciones de IgGIV líquidas.

55 Así pues, las composiciones de IgGIV líquidas, disponibles comercialmente, comprenden unos estabilizadores específicos diferentes de los que se utilizan para la forma liofilizada correspondiente. A título de ejemplo, las composiciones líquidas de IgGIV que contienen como estabilizadores maltosa al 10 %, glicina entre 0,16 y 0,24 M y

D-sorbitol al 5 % se conocen respectivamente bajo los nombres comerciales Gamimune NTM, Gamimune NTM 10% (Miles Inc.) y VenoglobulinTM (Alpha).

La diferente naturaleza de los compuestos utilizados para la estabilización de las composiciones de IgG en forma líquida y en forma liofilizada ha llevado a algunos autores a buscar estabilizadores o mezclas de estabilizadores idénticos que permitan conservar las composiciones de IgG en las dos formas a la vez. A este respecto, estudios recientes han tratado sobre la estabilización de composiciones de IgGIV, Vigam-S y Vigam Liquid (nombres de comerciales de National Blood Authority, Inglaterra) líquidas y tras la liofilización (Vigam-S) que comprenden una mezcla idéntica de estabilizadores, esto es la albúmina y la sacarosa (K. Chidwick y otros, Vox Sanguinis, 77, págs. 204-209, 1999). Sin embargo, la solución Vigam Liquid se acondiciona en un pH ácido (pH 5) lo que presenta el inconveniente de transformar, por hidrólisis, la sacarosa en azúcares reductores (fructosa y glucosa) que se condensan con los residuos aminados de la lisina de las IgG y de la albúmina para dar una base de Schiff inestable que desarrolla unos productos de Maillard (empardecimiento de la solución). Es evidente que el empleo de excipientes que evolucionan a lo largo de la conservación de las IgG no resulta satisfactorio, ya que no es posible el control de la reacción, una vez iniciada esta.

Por otra parte, algunos de los estabilizadores mencionados con anterioridad, como la maltosa o la sacarosa, no se pueden utilizar sin riesgo en aquellos sujetos que presentan insuficiencia renal y/o que padecen diabetes.

Con el fin de resolver los anteriores inconvenientes, la solicitante se ha comprometido a desarrollar una formulación estabilizadora única, farmacéuticamente aceptable, que cumple con el objetivo de garantizar la estabilización de las dos formas de conservación consideradas de las IgG a la vez y conservar, e incluso mejorar, la eficacia terapéutica de estas IgG.

Esta formulación estabilizadora presenta, en particular, la ventaja de precisar la aplicación de una única formulación lo que facilita el control de las materias primas y conlleva una reducción de los costes de fabricación asociados a la simplificación de los esquemas de producción.

Para ello, partiendo del hecho de que se utilizan azúcares y ácidos aminados como estabilizadores, la solicitante ha mostrado, sobre la base de ensayos preliminares, que algunos de estos aportaban a las composiciones de IgG líquidas unas propiedades protectoras frente a las desnaturalizaciones térmica y por agitación provocadas, pero con unos resultados variables según la naturaleza del azúcar y del ácido aminado seleccionados, y que, además, los efectos estabilizadores de una mezcla, por ejemplo de dos componentes, no se podrían inferir del efecto estabilizador que se obtiene con cada componente considerado de forma individual. Además, entre los azúcares probados, algunos de estos no eran estables en pH ácidos que corresponden al medio de acondicionamiento óptimo de las composiciones de IgG líquidas.

Por otra parte, los estabilizadores escogidos tras los ensayos previos no permitían minimizar la inestabilidad de las composiciones de IgG líquidas frente a la oxidación provocada. La solicitante ha añadido entonces un detergente no iónico como el Tween® 80 o el Triton® X 100 y ha obtenido resultados satisfactorios.

La invención se refiere a una formulación estabilizadora para una composición de inmunoglobulina G policlonal, caracterizada porque está constituida por un azúcar alcohólico, la glicina, con una concentración comprendida entre 7 g/l y 10 g/l, y un detergente no iónico con una concentración comprendida entre 20 y 50 ppm, para ser de este modo adecuada para la estabilización de composiciones de inmunoglobulina G policlonal en forma líquida y para la estabilización de composiciones de inmunoglobulina G policlonal en forma liofilizada.

La formulación de acuerdo con la invención está constituida por dichos azúcar alcohólico, glicina y detergente no iónico. Dicha formulación estabilizadora constituida exclusivamente por estos tres compuestos de acuerdo con la invención, presenta la ventaja de ofrecer una estabilización conjunta de las composiciones de IgG liofilizadas y no liofilizadas, y una reducción de los tiempos y de los costes de preparación a escala industrial gracias a la presencia de un número mínimo eficaz de estabilizadores.

En el marco de la invención, las composiciones de IgG líquidas significan tanto unas soluciones acuosas de concentrados de IgG policlonal, directamente obtenidas mediante el fraccionamiento de plasma humano, como las reconstituidas en un medio acuoso adecuado tras la liofilización de las anteriores. El medio acuoso de reconstitución es agua para preparación inyectable (agua PPI) que puede contener unos excipientes farmacéuticamente aceptables y compatibles con la IgG. Estas composiciones de IgG pueden experimentar a continuación unas etapas específicas de inactivación/eliminación de virus. De preferencia, los métodos de fraccionamiento del plasma son los que describen Cohn y otros (J. Am. Chem. Soc., 68, pág. 459, 1946), Kistler y otros (Vox Sang., 7, 1962, págs. 414-424), Steinbuch y otros (Rev. Franç. Et. Clin. et Biol., XIV, pág. 1.054, 1969) y en la solicitud de patente WO 94/9334.

Entre los azúcares considerados, los azúcares alcohólicos los ha seleccionado la solicitante basándose en criterios de estabilidad en pH ácidos de acondicionamiento de las composiciones de IgG, lo que evita las reacciones de Maillard en la inmunoglobulina G, de compatibilidad farmacéutica, y en criterios relativos a su acción estabilizadora únicamente de composiciones líquidas de IgG o bien de las liofilizadas. En efecto, se ha observado que un azúcar alcohólico dado utilizado como único estabilizador solo podía corresponder a una forma líquida.

Entre los azúcares alcohólicos, los que se utilizan de preferencia de acuerdo con la invención son el manitol, el sorbitol o sus isómeros, y, de manera aun más preferente, el manitol.

La glicina, presente en la formulación estabilizadora de la invención, es conocida por ser adecuada para la estabilización de composiciones de IgG, pero en forma líquida únicamente.

5 La adición de un detergente no iónico ha mejorado, por sinergia, de forma inesperada, el efecto protector de la formulación. Los detergentes no iónicos adecuados se seleccionan de manera ventajosa dentro del grupo constituido por el Tween®80 (polioxietilenosorbitano-monooleato), el Tween®20 (polioxietilenosorbitano-monolaurato), el Triton® X 100 (octoxinol 10) y el Pluronic®F68 (glicol de polietileno polipropileno). De preferencia, se han utilizado el Tween®80 y el Triton® X 100.

10 Las concentraciones de estos compuestos las seleccionará el experto en la materia de tal modo que se obtenga el efecto estabilizador deseado de las composiciones de IgG liofilizadas y no liofilizadas.

De preferencia, las concentraciones de manitol están comprendidas entre 30 g/l y 50 g/l.

15 La invención también se refiere a las composiciones de IgG en forma líquida y/o en forma liofilizada que comprenden la formulación estabilizadora de la invención, pudiendo además ser para uso terapéutico y, en particular, inyectables por vía intravenosa. Estas composiciones de IgG, en forma líquida y/o en forma liofilizada, gracias a la presencia de la formulación estabilizadora de la invención, presentan una tasa de dímeros inferior al 7 %, tras un almacenamiento durante un periodo de 24 meses a 4 °C. Se observa que el almacenamiento de las composiciones de IgG en forma líquida durante 6 meses a temperatura ambiente genera una tasa de polímeros muy por debajo de las normas fijadas por la Farmacopea Europea (3 %), esto es menos de un 0,3 % aproximadamente. Las composiciones de IgG 20 en forma liofilizada presentan una tasa de polímero aproximadamente 10 veces menor a la permitida, tras su almacenamiento durante 12 meses a temperatura ambiente o durante 6 meses a 40 °C.

La invención se refiere, además, al uso de una formulación estabilizadora de acuerdo con la invención, para la estabilización de composiciones de inmunoglobulina G en forma líquida directamente obtenidas por fraccionamiento de plasma humano, en forma liofilizada y de las obtenidas tras la reconstitución en un medio acuoso adecuado de 25 las formas liofilizadas.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin por ello limitar su alcance, en referencia a la figura 1 que representa un gráfico de las variaciones de la presión arterial en ratas en función del tiempo, tras la inyección de diferentes composiciones de inmunoglobulina G mencionadas con anterioridad.

Ejemplo 1: Elaboración de la formulación estabilizadora.

30 Se utiliza como composición de IgG un concentrado obtenido de acuerdo con el método desarrollado por la solicitante en la solicitud de patente internacional WO 02/092632. Este concentrado, que contiene alrededor de 50 g/l de IgG, se ajusta a un pH comprendido entre 4,6 y 4,8, y se somete a un tratamiento térmico de 2 horas a 56 °C para eliminar las impurezas termolábiles.

35 A este concentrado de IgG, se le añade el manitol, la glicina y el Tween®80 o el Triton® X 100, solos o mezclados, (soluciones de prueba) con las concentraciones que se detallan en la tabla 1.

Tabla 1: Características de las soluciones de prueba

Solución de prueba	Manitol (50 g/l)	Glicina (10 g/l)	Detergente (50 ppm)
A (de control)	0	0	0
B	1	0	0
C	0	1	0
D	1	1	0
E	0	0	1 (Triton® X 100)
F	0	0	1 (Tween®80)
G	1	0	1 (Triton® X 100)
H	1	0	1 (Tween®80)
I	1	1	1 (Triton® X 100)
J	1	1	1 (Tween®80)
0 : Ausencia del compuesto considerado 1 : Presencia del compuesto considerado			

Las soluciones de prueba se someten a continuación a diferentes pruebas de estrés térmico, de agitación y de oxidación con el fin de determinar su grado de desnaturalización mediante la observación de la presencia eventual de residuos (partículas, agregados).

- 5 La prueba de estrés térmico se realiza de acuerdo con la publicación de P. Fernandes y otros, Vox Sanguinis, 1980, 39, págs. 101-112. De forma resumida, unas muestras de 5 ml de solución de prueba se colocan dentro de unos recipientes de cristal de 10 ml de capacidad y se calientan a continuación al baño maría a 57 °C durante 4 horas. La influencia del calentamiento en las soluciones de prueba se determina mediante la medición de la diferencia de turbidez después y antes de la prueba de estrés térmico. Cuanto más bajos son los valores de turbidez más estables son las soluciones de IgG frente al estrés térmico aplicado.
- 10 Los ensayos de estrés de agitación se llevan a cabo tal y como se describe en la publicación de H. Levine y otros, Journal of Parental Science & technology, 1991, vol. 45, nº. 3, págs. 160-165. Así pues, se colocan unas muestras de 5 ml de solución de prueba dentro de unos tubos de cristal de 10 ml de capacidad protegidos de la luz, a continuación se pone cada tubo en posición tumbada sobre un agitador IKA Vibrax VXR (de la marca Fisher Scientific, Francia), y se agitan a continuación a 150 vueltas por minutos durante 18 horas a temperatura ambiente.
- 15 Los resultados de la prueba de estrés de agitación se determinan mediante la comparación de los aspectos visuales de las soluciones de prueba antes y después de la prueba de estrés aplicada. Para ello, se define una escala con los siguientes valores arbitrarios:
- 0,25: solución clara con una o dos partículas en suspensión;
0,50: solución clara con algunas partículas finas en suspensión;
0,75: solución clara con unas pocas partículas más en suspensión que para la de 0,50;
2,0: aspecto visual ligeramente modificado con más partículas en suspensión;
5,0: numerosos filamentos o partículas en suspensión;
10,0: partículas más gruesas y agregados, e incluso coagulados.
- 20 La prueba de estrés de oxidación se realiza sobre unas muestras de 5 ml de solución de prueba situadas dentro de unos recipientes de cristal de 10 ml. La superficie del líquido se pone en presencia de una atmósfera rica en oxígeno ($O_2 > 21\%$) durante entre 3 y 4 s. Tras el cierre y la agitación de los recipientes, estos se enfrían a una temperatura de 5 °C durante 15 minutos. Los resultados se determinan mediante la comparación de los aspectos visuales de las soluciones de prueba antes y después de la prueba de estrés de oxidación aplicada. Los resultados se pueden cuantificar de acuerdo con una escala de valores idéntica a la definida para la prueba de estrés de agitación.
- 25 Los diferentes resultados de medición que se obtienen tras la aplicación de las diferentes pruebas de estrés anteriores, se presentan en la tabla 2.

Tabla 2

Solución de prueba	Turbidez (NTU*)	Antes de la prueba de estrés	Tras prueba de estrés de agitación	Tras prueba de estrés de oxidación
A	0,73	0,5	5,0	2,0
B	0,21	0,5	3,5	2,0
C	0,63	0,5	0,5	3,5
D	0,42	0,25	10,0	2,0
E	0,84	0,5	1,25	1,25
F	0,36	0,5	1,25	2,0
G	0,45	0,25	0,75	0,5
H	0,16	0,25	0,5	1,25
I	0,41	0,25	0,5	0,75
J	0,39	0,25	0,5	1,25
*NTU: Normalized Turbidity Units				

- 35 Los resultados obtenidos muestran, en primer lugar, que la adición de un único estabilizador a una solución de concentrado de IgG (soluciones B, C, E, F) con respecto a la solución de control A que no comprende estabilizador, permite mejorar la protección frente a dos de las tres pruebas de estrés aplicadas. Por otra parte, la presencia conjunta de manitol y de glicina (solución D) no es deseable, siendo los resultados de la prueba de estrés de agitación claramente inferiores a los que se obtienen con el manitol y la glicina solos (soluciones B o C) o incluso con respecto a la solución de control A. Este resultado indica la importancia de la elección de los componentes para
- 40 la elaboración de la formulación estabilizadora de acuerdo con la invención que no se puede inferir, en

consecuencia, únicamente de los efectos de los estabilizadores considerados de forma individual. En cambio, los ensayos llevados a cabo sobre las soluciones de prueba muestran que las formulaciones específicas de los estabilizadores considerados I y J ofrecen una protección muy satisfactoria frente a la desnaturalización vinculada a las tres pruebas de estrés aplicadas con respecto a la solución de control A que no comprende estabilizador. Las soluciones de prueba G y H que contienen las formulaciones estabilizadoras que no son de acuerdo con la invención, dan no obstante también unos resultados satisfactorios en esta etapa.

Ejemplo 2

Con el fin de determinar de una forma cuantitativa la tasa de polímeros y, en particular, de dímeros presentes en las soluciones de prueba G, H, I y J que han experimentado la prueba de estrés de agitación de acuerdo con el ejemplo 1, estas se someten a una cromatografía de exclusión estérica de acuerdo con el modo operativo que se describe en el Método de la Farmacopea Europea (Farmacopea Europea, cuarta edición, capítulo "Inmunoglobulina humana normal para administración par vía intravenosa", método 2.2.29).

La tabla 3 presenta los porcentajes obtenidos de dímeros y polímeros.

Tabla 3

Solución de prueba	Dímeros (%)	Polímeros (%)
G	5,90	3,30
H	7,11	3,37
I	4,98	2,17
J	3,50	1,80

Los porcentajes más bajos de polímeros se obtienen con las soluciones de prueba I y J. Estos resultados confirman que las formulaciones específicas de los estabilizadores considerados I y J ofrecen una protección muy satisfactoria frente a la desnaturalización vinculada a la prueba de estrés de agitación aplicada, tal y como se describe en el ejemplo 1.

Tras la selección de las fórmulas I y J, sólo se escoge la solución de prueba J para el siguiente ejemplo, ya que esta contiene un detergente no iónico farmacéuticamente aceptable, esto es el Tween®80.

Ejemplo 3

La solución J en forma líquida (denominada de aquí en adelante "IgG líquida") se somete a unos ensayos de estabilidad en función del tiempo de almacenamiento en unas condiciones habituales de temperatura (4 °C). Se procede a unos ensayos idénticos para la solución J liofilizada (duración de la liofilización de 45 ± 3 h), denominada de aquí en adelante "IgG liofilizada". Estos ensayos de estabilidad se llevan a cabo sobre las soluciones J líquidas, reconstituidas llegado el caso con agua para preparación inyectable. Estos consisten en el seguimiento en un periodo de tiempo de 24 meses, de la evolución de los cuatro parámetros que se definen a continuación, tres de los cuales se determinan en referencia los métodos que se indican en la Farmacopea Europea, cuarta edición, capítulo "Inmunoglobulina humana normal para administración por vía intravenosa":

- (a) Evolución de la tasa de dímeros determinada mediante cromatografía de exclusión estérica (método 2.2.29);
- (b) Evolución de la actividad anticomplementaria (método 2.6.17); y
- (c) Evolución del grado de anticuerpos específicos contra el virus de la hepatitis B, anti HBs (método 2.7.1).

El cuarto parámetro (d) define la evolución de las tasas de IgG3 mediante una dosificación nefelemétrica conocida por el experto en la materia, en presencia de anti IgG3 específicas (DADE-Behring: kit anti IgG3).

Las mediciones se llevan a cabo respectivamente tras un periodo de almacenamiento de 12 meses y de 24 meses después de la preparación de la solución J líquida (t_0).

Los resultados de las mediciones obtenidos para cada ensayo se presentan en las siguientes tablas y los valores que se ofrecen representan los valores medios de los tres ensayos.

(a) Tasa de dímeros: tabla 4

	t_0 (%)	t_{12} meses (%)	t_{24} meses (%)
IgG líquida	$3,2 \pm 0$	$5,0 \pm 1,0$	$5,5 \pm 1,1$
IgG liofilizada	$3,2 \pm 0$	$3,5 \pm 0,7$	$5,0 \pm 1,0$

El aumento de la tasa de dímeros a lo largo del tiempo de almacenamiento se mantiene dentro de los límites de precisión de los ensayos y no es lo suficientemente significativo como para que se pueda constatar una degradación cuantitativa de las composiciones consideradas.

(b) Actividad anticomplementaria: tabla 5

	t_0 (%)	t_{12} meses (%)	t_{24} meses (%)
IgG líquida	35 ± 0	30 ± 6	28 ± 5
IgG liofilizada	31 ± 0	31 ± 4	31 ± 7

- 5 También se observa un ligero descenso de la actividad anticomplementaria para las composiciones de IgG líquidas, mientras que la relativa a las composiciones de IgG liofilizadas no varía. Esta disminución no tiene una repercusión clínica, únicamente un aumento de esta actividad sería desfavorable en términos de uso.

(c) Dosificación anti HBs: tabla 6

	t_0 (UI/ml)	t_{12} meses (UI/ml)	t_{24} meses (UI/ml)
IgG líquida	$12,0 \pm 0$	$11,5 \pm 2,5$	$11,0 \pm 2,0$
IgG liofilizada	$10,0 \pm 0$	$10,0 \pm 2,2$	$10,5 \pm 2,4$

- 10 Aunque parece producirse un muy ligero descenso en las composiciones de IgG líquidas, no se observa ninguna variación importante, en particular para las composiciones de IgG liofilizadas.

(d) Tasa de IgG3: tabla 7

	t_0 (g/l)	t_{12} meses (g/l)	t_{24} meses (g/l)
IgG líquida	1,1	$1,0 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,1$
IgG liofilizada	1,1	$0,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$

Las variaciones observadas se inscriben en el margen de incertidumbre de los valores de las tasas de IgG3. Estas no son, por lo tanto, significativas.

- 15 Los cuatro parámetros analizados anteriormente demuestran que la formulación de la presente invención es especialmente adecuada para la estabilización de composiciones de IgG ya sea en forma líquida, o en forma liofilizada durante 24 meses a una temperatura de 4 °C sin una evolución importante de estas, lo que se traduciría, en el caso contrario, en una degradación del producto y por tanto no permitiría su uso clínico.

Ejemplo 4

- 20 Se utiliza como composición de IgG, la definida en el ejemplo 1. A este concentrado de IgG se le añade manitol, glicina y Tween®80 de acuerdo con unas concentraciones respectivas de 32 g/l, 7 g/l y 50 ppm. La solución K en forma líquida obtenida de este modo (denominada de aquí en adelante "IgG líquida") se somete a unos ensayos de estabilidad en función del tiempo de almacenamiento a 4 °C, a temperatura ambiente y a 40 °C. Se procede a unos ensayos idénticos para la solución K liofilizada (duración de la liofilización de 45 ± 3 h), denominada de aquí en adelante "IgG liofilizada". Estos ensayos de estabilidad se llevan a cabo sobre las soluciones K líquidas,
- 25 reconstituidas llegado el caso con agua para preparación inyectable. Estos consisten en el seguimiento durante un periodo de tiempo de 12 meses de la evolución de la tasa de polímeros determinada mediante cromatografía de exclusión estérica en referencia al método 2.2.29 indicado en la Farmacopea Europea, detallado en el ejemplo 3. De acuerdo con las normas fijadas por la Farmacopea Europea, el umbral máximo permitido es del 3 %.

- 30 Las mediciones se llevan a cabo respectivamente tras un periodo de almacenamiento de 3, 6 y 12 meses después de la preparación de la solución K líquida (t_0).

Los resultados obtenidos de las mediciones para cada ensayo, en las tres temperaturas de almacenamiento anteriores, se presentan respectivamente en las siguientes tablas 8, 9 y 10, y los valores que se ofrecen representan los valores medios de los tres ensayos.

Tabla 8

T: 4 °C	t_0 (%)	t_3 meses (%)	t_6 meses (%)	t_{12} meses (%)
IgG líquida	$0,057 \pm 0,003$	$0,02 \pm 0,005$	$0,2 \pm 0,03$	-
IgG liofilizada	$0,23 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,08$	$0,23 \pm 0,09$	$0,18 \pm 0,07$

Tabla 9

T: ambiente	t ₀ (%)	t ₃ meses (%)	t ₆ meses (%)	t ₁₂ meses (%)
IgG líquida	0,057 ± 0,003	0,02 ± 0,01	0,19 ± 0,03	-
IgG liofilizada	0,23 ± 0,05	0,24 ± 0,08	0,20 ± 0,1	0,20 ± 0,01

Tabla 10

T: 40 °C	t ₀ (%)	t ₃ meses (%)	t ₆ meses (%)	t ₁₂ meses (%)
IgG líquida	0,057 ± 0,003	1,20 ± 0,08	6,23 ± 0,03	-
IgG liofilizada	0,47 ± 0,3	0,55 ± 0,1	0,20 ± 0,1	-

El tiempo de almacenamiento de las composiciones de IgG líquidas es de 3 meses a 40 °C. Al término de 6 meses de almacenamiento de estas a 4 °C y a temperatura ambiente, la tasa de polímeros observada está muy por debajo de las normas fijadas por la Farmacopea Europea. Para la composiciones de IgG liofilizadas, el almacenamiento durante 12 meses a 4 °C y a temperatura ambiente genera una tasa de polímero 10 veces menor que la permitida. Se observa la misma tasa tras un almacenamiento de 6 meses a 40 °C.

Ejemplo 5

Este ejemplo está destinado a confirmar que las soluciones de la invención, que presentan una tasa de dímeros inferior al 7 %, no inducen efectos hipotensores tras su inyección *in vivo*. Según Bleeker W. K. y otros (Blood, 95, 2000, págs. 1.856-1.861), los dímeros de inmunoglobulina G tienen unas propiedades hipotensivas *in vivo* más importantes cuanto más alto es su contenido en la muestra de IgG que hay que inyectar. El tratamiento de enfermedades auto-inmunes que precisan la inyección de dosis masivas de IgG puede presentar, por lo tanto, riesgos en aquellos pacientes que padecen hipotensión si no se controla el contenido de los dímeros de IgG.

El objetivo de los estudios presentados en este ejemplo es evaluar y comparar los efectos hemodinámicos de dos soluciones de IgG en forma líquida, que son respectivamente una solución de IgG clásica (solución T - IgG: 50 g/l; sacarosa: 100 g/l; NaCl: 3 g/l; pH: 6,5), que presenta una tasa de dímeros del 11,50 %, y la solución K del ejemplo anterior que presenta una tasa de dímeros del 6,3 %, en ratas anestesiadas preparadas.

Modo operativo

Se anestesian unas ratas macho adultas Sprague-Dawley (IFFA-Credo: Francia) de 180-200 g mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital (Sanofi - Francia) a razón de 60 mg/kg. La rata anestesiada se tumba sobre la espalda en un colchón termostatzado a 37 °C. Un catéter colocado en la carótida, unido a un sensor de presión y a un registrador clásicos, permite medir de forma continua la presión arterial. Una cánula traqueal permite despejar las vías respiratorias. Las inyecciones intravenosas de IgG (soluciones K y T) se realizan a través de un catéter situado en la vena yugular del animal, a razón de 2,66 ml/120 min.

Se miden las variaciones de la presión arterial (mm Hg) de tres grupos de 6 ratas cada uno, en función del tiempo:

- un grupo de control, que recibe suero fisiológico;
- un grupo tratado, que recibe la solución T a razón de 0,65 g/kg; y
- un grupo tratado, que recibe la solución K a razón de 0,65 g/kg.

Los ensayos comienzan con una fase previa de estabilización de 20 min. El registro de forma continua de la presión arterial empieza en t₀-10 min (t₀ = inyección).

Los resultados de estos estudios se infieren del gráfico de la figura 1, en la cual cada punto del gráfico representa un valor medio, con la desviación-tipo, de 6 ensayos. El análisis estadístico se realiza mediante el análisis de la varianza seguido de la prueba de Scheffé conocida por el experto en la materia.

Estos resultados muestran que los valores de la presión arterial, previamente a la inyección de las IgG, son estables y comparables en los tres grupos de ratas. En t₀+10 min, se observa una caída de la presión arterial que alcanza su mínimo aproximadamente en t₀+15 min con un valor inferior al 50 % del valor inicial antes de la inyección (que pasa de alrededor de 100 mm Hg a alrededor de 50 mm Hg), seguida de un retorno progresivo a los valores iniciales de presión que se alcanzan entre 50 y 60 minutos tras el inicio de la inyección.

Ejemplo 6

Este ejemplo está destinado a verificar que la solución J en forma líquida contribuye a la reducción de la viscosidad sanguínea, con respecto a unas soluciones que comprenden proteínas y diferentes excipientes. A este título, se han llevado a cabo dos ensayos de sedimentación de glóbulos rojos por gravedad de acuerdo con los métodos

conocidos por el experto en la materia, a temperatura ambiente y a $T = 37^{\circ}\text{C}$.

Modo operativo

5 Se lavan unos glóbulos rojos humanos de grupo O+ en presencia de una solución anticoagulante de citrato trisódico 0,2 M (1/9, v/v) tres veces con una solución salina de PBS en la concentración habitual, pH 7,4. Se preparan unas
10 soluciones acuosas de proteínas en excipientes diferentes, entre los que está la solución J que se ajusta a NaCl 0,15 M y pH 7. Las proteínas y los excipientes, así como sus concentraciones respectivas, se indican en la tabla 11. Se extraen 4,5 ml de cada una de las soluciones proteínicas que se colocan dentro de un tubo graduado de cristal de 10 ml. A continuación se añaden a cada solución 0,5 ml de glóbulos rojos lavados. Las mezclas obtenidas de este modo se homogeneizan volteando 3-4 veces los tubos tapados. Al final de la homogeneización, los tubos se ponen en reposo en un expositor y se mide el tiempo necesario para que aparezca una línea clara de decantación de los glóbulos rojos tangente al menisco transparente, que refleja la velocidad de sedimentación. Los resultados de los ensayos a temperatura ambiente se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Ensayos a T ambiente

Proteína (s)	Solución	Tiempo de sedimentación en el menisco (min.)	Observaciones
-	PBS	22,70	De control (sin proteína)
Albúmina (5%)	NaCl: 2 g/l	35,90	Proteína oncótica
Plasma humano	NaCl: 2 g/l Citrato trisódico: 0,02 M	28,42	Todas las proteínas presentes
IgG (50 g/l)	Sacarosa: 100 g/l NaCl: 3 g/l	31,25	Formulación de la técnica anterior
Solución J	+ NaCl: 0,15 M	9,25	Formulación de la invención
Fibrinógeno (15 g/l)	Arginina: 40 g/l Citrato trisódico: 2,5 g/l Lisina: 2 g/l	12,60	Presencia de aglutinados

15 Los resultados obtenidos muestran que los glóbulos rojos considerados, en presencia de IgG de la solución J de la invención, sedimentan muy rápido, lo que se acomoda a una reducción de la viscosidad de la mezcla estudiada, lo que permite por tanto una mejor fluidez de la sangre.

20 Se han llevado a cabo otros ensayos considerando las mezclas anteriores (4,5 ml de soluciones proteínicas y 0,5 ml de glóbulos rojos lavados) colocadas dentro de unos tubos graduados de cristal de 10 ml y homogeneizadas volteando 3-4 veces los tubos. Una vez acabada esta operación, estos se colocan de tal forma que su contenido sedimente durante un intervalo de tiempo de 1 hora en un ángulo de 45° , a una temperatura de 37°C y se mide el volumen del sobrenadante para las mezclas consideradas. Los resultados de los ensayos a $T = 37^{\circ}\text{C}$ se muestran en la tabla 12.

Tabla 12: Ensayos de $T = 37^{\circ}\text{C}$

Proteína(s)	Solución	Volumen de sobrenadante tras 1 hora (ml)
-	PBS	2,5
Albúmina (5 %)	NaCl: 2 g/l	2,5
Plasma humano	NaCl: 2 g/l Citrato trisódico: 0,02 M	4
IgG (50 g/l)	Sacarosa: 100 g/l NaCl: 3 g/l	1*
Solución J	+ NaCl: 0,15 M	2,5
*: sobrenadante que presenta signos de hemólisis		

El análisis de los resultados de la tabla 12 muestra que:

- al ser el volumen de sobrenadante para la mezcla de plasma el más elevado de las mezclas estudiadas, esta presenta por lo tanto la viscosidad correspondiente más baja;
las mezclas de albúmina y de solución J de la invención presentan una velocidad de sedimentación idéntica (mismo volumen de sobrenadante);
- la mezcla de IgG de la técnica anterior, es decir la que comprende sacarosa y NaCl, conduce al volumen de sobrenadante más bajo, lo que significa que los glóbulos rojos sedimentan más lentamente que en la mezcla J de la invención, así como en las otras mezclas estudiadas más arriba, siendo además el sobrenadante de color rosado debido a su discreta hemólisis.

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n estabilizadora para una composici3n de inmunoglobulina G policlona1, **caracterizada porque** est1 constituida por un az1car alcoh3lico, la glicina, con una concentraci3n comprendida entre 7 g/l y 10 g/l y un detergente no i3nico con una concentraci3n comprendida entre 20 y 50 ppm, para ser de este modo adecuada para la estabilizaci3n de composiciones de inmunoglobulina G policlona1 en forma l1quida y para la estabilizaci3n de composiciones de inmunoglobulina G policlona1 en forma liofilizada.
2. Formulaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 1, **caracterizada porque** el az1car alcoh3lico es el manitol.
3. Formulaci3n de acuerdo con la reivindicaci3n 2, **caracterizada porque** la concentraci3n de manitol est1 comprendida entre 30 g/l y 50 g/l.
4. Composici3n de inmunoglobulina G policlona1 en forma l1quida que comprende, como estabilizador, la formulaci3n estabilizadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Composici3n de inmunoglobulina G policlona1 en forma liofilizada, obtenida mediante la liofilizaci3n de una composici3n de inmunoglobulina G policlona1 y de la formulaci3n estabilizadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Composici3n de inmunoglobulina G policlona1 de acuerdo con la reivindicaci3n 4, **caracterizada porque** presenta una tasa de pol1meros inferior al 0,3 % tras un almacenamiento de 6 meses a temperatura ambiente.
7. Composici3n de inmunoglobulina G policlona1 de acuerdo con la reivindicaci3n 5, **caracterizada porque** presenta una tasa de pol1meros inferior al 0,3 % tras un almacenamiento de 12 meses a temperatura ambiente o de 6 meses a 40 3C.
8. Composici3n de inmunoglobulina G policlona1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, **caracterizada porque** presenta una tasa de d1meros inferior al 7 % tras un almacenamiento durante un periodo de 24 meses a 4 3C.
9. Uso de una formulaci3n estabilizadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, como estabilizador de composiciones de inmunoglobulina G policlona1 en forma l1quida directamente obtenidas por el fraccionamiento de plasma humano.
10. Uso de una formulaci3n estabilizadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la estabilizaci3n de composiciones de inmunoglobulina G policlona1 en forma liofilizada.
11. Uso de una formulaci3n estabilizadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la estabilizaci3n de composiciones de inmunoglobulina G policlona1 en forma l1quida obtenidas mediante la reconstituci3n en un medio acuoso adecuado de composiciones de inmunoglobulina G policlona1 en forma liofilizada.

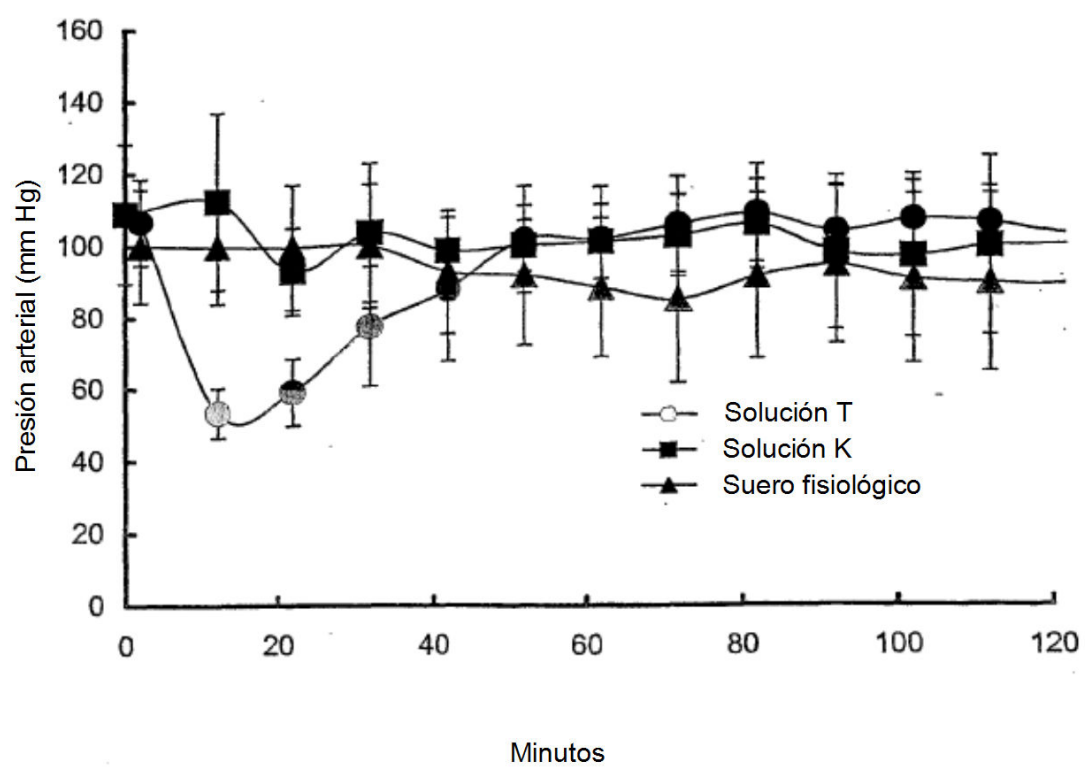


Fig. 1