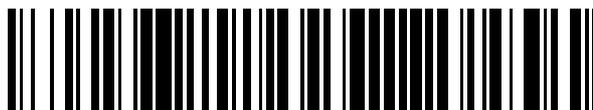


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 457**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2005 E 05807416 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1812475**

54 Título: **Fracciones de inmunoglobulina**

30 Prioridad:

02.11.2004 EP 04025936

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

11.02.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MIESCHER, SYLVIA y
BOLLI, REINHARD, FRANZ**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 442 457 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

Fracciones de inmunoglobulina

5 La presente invención se refiere a nuevas composiciones farmacéuticas que comprenden fracciones de preparaciones de inmunoglobulinas humanas, a nuevas aplicaciones de estas composiciones y a un método para la fabricación de dichas composiciones.

10 Las preparaciones de inmunoglobulina intravenosa (IGIV) se derivan de plasma acumulado de miles de donantes sanos (los tamaños corrientes de los acumulados varían de 1000-60 000) y contienen anticuerpos inmunes y naturales (NABs) que reflejan la experiencia antigénica acumulada de la población de donantes. Por lo tanto, IGIV contiene un amplio espectro de los denominados "anticuerpos inmunes" especificidades dirigidas contra patógenos y antígenos extraños así como de NAB que reaccionan con los antígenos propios/autoantígenos. Los NAB se definen así porque se generan en ausencia de inmunización deliberada e independientemente de la exposición a antígenos extraños (1). De hecho se ha detectado una larga lista de anticuerpos contra antígenos propios e incluso se han purificado por cromatografía de afinidad de preparaciones de IGIV. Estos NAB suelen ser polirreactivos, se pueden unir a los patógenos y mediante marcado y depuración de la circulación de moléculas y células senescentes o alteradas, son importantes en el mantenimiento de la inmunohomeostasis (2). Además, se ha propuesto que estos NAB reconocen un subconjunto conservado de antígenos inmunodominantes denominado el homínulo inmunológico que es esencial para mantener la autotolerancia (3). Sin embargo, no se ha definido una caracterización más precisa de estos anticuerpos, sus propiedades y su posible presencia en una subfracción de la IGIV en parte debido a la escasez de conocimientos sobre los antígenos y anticuerpos blanco pertinentes.

25 Las aplicaciones terapéuticas actuales de IGIV cubren 2 categorías principales: i) reemplazo de anticuerpos en deficiencias de anticuerpos primarios y secundarios (4) ii) inmunomodulación en los pacientes con enfermedades inflamatorias sistémicas y autoinmunitarias (2, 5). Si bien IGIV ha demostrado eficacia clínica en las deficiencias de anticuerpos y en algunas enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias [(por ejemplo púrpura trombocitopénica inmunitaria (PTI), síndrome de Guillain Barré (SGB), enfermedad de Kawasaki, Polineuropatía Desmielinizante Inflamatoria Crónica (PDIC)] hay muchos ejemplos de beneficios clínicos no confirmados/equívocos en otras afecciones autoinmunitarias e inflamatorias sistémicas a menudo debido a la falta de ensayos controlados que sean estadísticamente significativos.

35 El modo de acción de IGIV es complejo e involucra modulación de la expresión y la función de los receptores Fc, interferencia con la activación del complemento y la red de citocinas, modulación de la activación, la diferenciación y las funciones, efectoras en muchos tipos de células diferentes. Se ha propuesto la red de idiotipos como una red esencial implicada en la homeostasis inmunitaria con desequilibrios que eventualmente llevan a enfermedad autoinmunitaria ostensible. Muchas de las indicaciones terapéuticas actuales para la IGIV se basan en contrarrestar, neutralizar o bloquear anticuerpos autoinmunes patológicos y así restaurar una red de idiotipos sanos (6, 7). Los informes recientes también han demostrado efectos directos sobre los monocitos, las células dendríticas, endoteliales y los linfocitos tanto T como B. Esta complejidad refleja las funciones esenciales de los anticuerpos circulantes para mantener la homeostasis en los individuos sanos (2, 8).

45 Hay muchos informes en la bibliografía que demuestran la disminución de la reactividad inmunitaria con la edad, denominada inmunosenescencia (9). Sin embargo, parece que hay una estabilidad de vida larga de los anticuerpos IgG naturales que reaccionan con los antígenos propios en comparación con una diversificación dependiente de la edad de repertorios de anticuerpos IgG para los antígenos extraños con el aumento de la edad (10).

50 IGIV consiste en moléculas de IgG intactas con una distribución de isotipos de IgG correspondiente a la del suero humano normal y cantidades muy pequeñas de IgA. Dependiendo de la formulación, las preparaciones de IGIV contienen cantidades variables de IgG monomérica y dimérica. Los monómeros representan la IgG monomérica (aprox. peso molecular 150 000) mientras que los dímeros representan 2 moléculas de IgG las cuales a partir de los datos previos se pueden orientar como pares de idiotipo antiidiotipo clásicos (11).

55 EP-A-1394183 da a conocer un método para purificar autoanticuerpos de preparaciones de IGIV mediante cromatografía de afinidad en un ligando, por ejemplo una mezcla de proteínas presentes en el suero humano diferentes de la inmunoglobulina unida a un soporte sólido.

60 La patente de Estados Unidos 6,231,856 da a conocer composiciones de anticuerpos humanos que comprenden anticuerpos antiidiotípicos sustancialmente purificados y concentrados o sus fragmentos de unión al antígeno, para el tratamiento basado en anticuerpos de enfermedades autoinmunitarias. Las composiciones de anticuerpos se obtienen por cromatografía de afinidad.

65 Según la presente invención, se encontró que un fraccionamiento del tamaño de una preparación de inmunoglobulinas humanas da una fracción de anticuerpos diméricos y una fracción de anticuerpos monoméricos, que tienen características diferentes. La fracción dimérica muestra una mayor reactividad a los antígenos, por ej., los autoantígenos y/o los exoantígenos. Además, la fracción dimérica contiene anticuerpos con mayor afinidad por los

antígenos blanco y por lo tanto puede tener una mayor actividad biológica, por ej., actividad neutralizante en el caso de actividades antibacterianas, antitoxinas o antivirales. En contraste, la fracción monomérica puede contener anticuerpos de menor afinidad, por ejemplo, anticuerpos naturales, es decir, el repertorio básico del cual se desarrollan los anticuerpos de alta afinidad.

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una fracción de anticuerpos humanos o sus fragmentos de unión al antígeno de una población heterogénea de donantes humanos donde la fracción se origina de los anticuerpos diméricos humanos.

10 Las fracciones se pueden obtener de cualquier preparación que comprenda una preparación de anticuerpos policlonales humanos de múltiples donantes. Preferentemente, las fracciones se obtienen de una preparación de IGIV.

15 En este contexto, una preparación de IGIV es una preparación de inmunoglobulinas humanas que se puede derivar del plasma acumulado de múltiples por ej. 1000-100 000 donantes de sangre. Los fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos se pueden obtener por métodos conocidos, por ejemplo por digestión proteolítica. Los fragmentos de anticuerpos preferidos son los fragmentos Fab o F(ab')₂.

20 Las fracciones monoméricas o diméricas se pueden obtener mediante fraccionamiento por tamaño de las preparaciones de anticuerpos humanos. El fraccionamiento por tamaño puede comprender: separación de exclusión por tamaño, filtración en gel, ultrafiltración, diafiltración u otros métodos de separación en gel o membrana. La fracción monomérica se puede obtener mediante recuperación de monómeros de anticuerpos con un peso molecular aparente de aproximadamente 150 kDa y la fracción dimérica se puede obtener mediante recuperación de dímeros de anticuerpos con un peso molecular aparente de aproximadamente 300 kDa.

Preferentemente, el fraccionamiento por tamaño comprende cromatografía de exclusión por tamaño, por ejemplo, en una columna Superose 6 o una Sephacryl S-300.

30 La pureza de las fracciones monomérica y dimérica obtenidas mediante fraccionamiento por tamaño se puede medir por HPLC analítica, por ej. cromatografía de exclusión por tamaño en una columna TSK G 3000 SWXL.

35 La pureza de la fracción dimérica de anticuerpos suele ser de al menos 75%, preferentemente de al menos 80% y más preferentemente de al menos 85% según lo determinado por HPLC analítica donde el análisis se realiza preferentemente inmediatamente después del fraccionamiento por tamaño.

40 La pureza de la fracción monomérica de anticuerpos es generalmente de al menos 85%, preferentemente de al menos 90% y más preferentemente de al menos 95% según se determina por HPLC analítica, donde el análisis se realiza preferentemente inmediatamente después del fraccionamiento por tamaño. La fracción dimérica de anticuerpos se caracteriza preferentemente por una mayor reactividad a los exoantígenos como el toxoide tetánico y/o el virus respiratorio sincicial (VRS) y/o la toxina A de *Pseudomonas aeruginosa* o autoantígenos como fantasmas de eritrocitos y/o células epiteliales Hep-2. Más particularmente, la fracción dimérica puede tener al menos dos veces más actividad específica contra el toxoide tetánico y/o el virus respiratorio sincicial en comparación con una preparación de IGIV no fraccionada según se determina en la sección de ejemplos. Además, la fracción dimérica puede tener una reactividad al menos dos veces mayor frente a una proteína de virulencia M de *S. pyogenes* y/o células epiteliales Hep-2 en particular para los antígenos intracelulares en comparación con una preparación de IGIV no fraccionada, según se determina en la sección de ejemplos.

50 La composición farmacéutica de la fracción dimérica de anticuerpos puede comprender anticuerpos en forma dimérica o en forma disociada o (re)monomerizada. Preferentemente los anticuerpos están en forma disociada o (re)monomerizada, donde el contenido de dímeros es 10% o menos, más preferentemente 5% o menos. La monomerización se puede llevar a cabo ajustando un pH ácido, por ejemplo un pH en el rango de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, preferentemente de aproximadamente 3.5 a aproximadamente 4.5, más preferentemente a un pH de aproximadamente 4.0. El pH se puede ajustar con cualquier tampón ácido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo ácido acético. La preparación monomerizada de anticuerpos diméricos es preferentemente dinámicamente estable y sustancialmente no se reconvierte a dímeros en las condiciones de almacenamiento y uso indicadas antes según se determina en la sección de ejemplos.

60 La fracción dimérica contiene anticuerpos con mayor actividad específica que la fracción monomérica. Por lo tanto, esta fracción se usa preferentemente para la fabricación de un medicamento contra las infecciones por un patógeno, por ejemplo infecciones virales, bacterianas, fúngicas, protozoarias o parasitarias. Se prefiere especialmente el uso de la fracción dimérica para el tratamiento de las infecciones agudas.

65 Otra aplicación preferida para la fracción dimérica es la fabricación de un medicamento por ejemplo contra los trastornos autoinmunitarios y/o para el mantenimiento de la homeostasis autoinmunitaria. La fracción dimérica contiene anticuerpos idiotípicos y antiidiotípicos, que son importantes para mantener un equilibrio interno. Los

dímeros muestran una autorreactividad fisiológica, que es mantenida bajo control por los anticuerpos antiidiotípicos correspondientes para evitar la expansión clonal de clones autorreactivos que lleve a una enfermedad autoinmunitaria. Por ejemplo la fracción dimérica monomerizada comparada con cualquier IGIV no fraccionada o la fracción monomérica muestra una mayor actividad contra el bucle 2 del receptor muscarínico 3 (M3R), uno de los antígenos blanco del síndrome de Sjögren, como se determina en la sección de ejemplos. Esta actividad sólo se revela cuando los anticuerpos idiotípicos y antiidiotípicos de la fracción dimérica se monomerizan.

Debido a la alta actividad específica, la fracción dimérica se puede administrar en dosis bajas, resultando en una mayor compatibilidad y menos efectos secundarios. Preferentemente, en esta realización de la invención, la preparación se administra en una dosis que es suficiente para obtener un efecto terapéutico sin causar efectos secundarios indeseados.

Por otra parte la fracción monomérica comprende tanto anticuerpos inmunes como naturales pero sin los anticuerpos antiidiotípicos y sería particularmente beneficiosa para mantener y reforzar un sistema inmunitario enfermo.

También se encontró sorprendentemente, que la fracción monomérica tiene una mayor reactividad a los polisacáridos de microorganismos, especialmente a los polisacáridos de diferentes serotipos de *Pseudomonas aeruginosa*.

El contenido de dímero de la preparación de monómeros está limitado preferentemente a una cantidad máxima de 7%, preferentemente de 2.5% y más preferentemente de 1% para evitar reacciones adversas para los grupos de tratamiento.

Otro aspecto de la presente invención es un método para la fabricación de composiciones farmacéuticas que comprendan fracciones de anticuerpos humanos o sus fragmentos de unión al antígeno de una población heterogénea de donantes humanos que consiste en:

- (a) someter una preparación de anticuerpos humanos de una población heterogénea de donantes a un fraccionamiento por tamaño,
- (b) recuperar una fracción de los anticuerpos diméricos y opcionalmente monomerizar los anticuerpos diméricos y
- (c) recuperar una fracción de anticuerpos monoméricos.

La fracción monomérica se caracteriza por tener un peso molecular de aproximadamente 150 kDa en el procedimiento de fraccionamiento por tamaño. La fracción dimérica se caracteriza por tener un peso molecular de aproximadamente 300 kD en el procedimiento de fraccionamiento por tamaño.

Además, la invención se explicará más detalladamente en los ejemplos siguientes.

Figuras y tablas

Figura 1

Optimización de la cromatografía y el fraccionamiento de las preparaciones de IGIV

Se probaron varias columnas como se mencionó antes utilizando diferentes velocidades de flujo, diferentes sistemas tampón y variando la capacidad de carga para una preparación de Sandoglobulina (SAGL) al 12%. Las fracciones se recogieron y analizaron por HPLC analítica para determinar el contenido de monómeros, dímeros y agregados.

Figura 2

Fraccionamiento preparativo de preparaciones de IGIV

Se equilibró una columna de Sephacryl S-300 (dimensiones 26/60) en PBS/0.92% de azida, seguido de la aplicación de 500 ml de una preparación de Sandoglobulina (SAGL) al 12%. La columna se corrió a una velocidad de flujo de 1.2 ml/min y se recogieron las fracciones 1-4 como se indicó antes y se analizaron por HPLC analítica para determinar el contenido de monómeros, dímeros y agregados. Esta columna permitió aumentar a la escala de laboratorio para la preparación de fracciones de monómeros y dímeros.

Figura 3

Perfiles de IGIV y fracciones monoméricas y diméricas separadas en HPLC analítica

Se usó HPLC analítica para analizar el % de dímeros, monómeros y agregados en las diferentes fracciones: IGIV recién disuelta de una preparación de SAGL al 12%; fracciones monoméricas y diméricas aisladas en una columna de Sephacryl S-300. La línea punteada muestra los dímeros y monómeros encontrados en SAGL sin separar.

5 Figura 4

Cinética de las fracciones de dímeros separadas

10 La fracción de dímeros separada se mantuvo a temperatura ambiente y se analizó a intervalos en un lapso de tiempo máximo de 48 h (rango mostrado 0-24 h) para observar la estabilidad de la fracción de dímeros con respecto a la disociación en monómeros. La línea recta representa el % de dímeros en la fracción dimérica, la línea punteada representa el % de monómeros en la fracción dimérica.

15 Figura 5

Diagrama de flujo para la separación de exclusión por tamaño de monómeros y dímeros de IGIV

20 Figura 6

Condiciones de pH óptimo para la preparación de las fracciones de dímeros monomerizados

25 Se recogieron y dializaron las fracciones dimérica y monomérica durante 24 h a 4 °C a valores de pH que variaron entre 4 y 7 utilizando tampones de citrato fosfato de pH 2.6-7 o tampón de ácido acético 10 mM de pH 4. Se realizó la diálisis usando membranas de diálisis Spectra/Por 4 con un peso molecular de corte (MWCO) de 12 000-14 000 (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, California) o un kit de Mini Diálisis con un MWCO de 8000 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Se llevó a cabo una HPLC analítica inmediatamente después de la diálisis. Paneles A, B, C: se muestran los perfiles de HPLC de las fracciones diméricas dializadas: dímeros pH 4 (A), pH 5 (B) y dímeros pH 7 (F).: paneles D, E, F: se muestran perfiles de HPLC de las fracciones monoméricas dializadas: monómeros pH 4 (D), pH 5 (E) y monómeros pH 7 (F).

30 Figura 7

Análisis PAGE 2D de fracciones separadas de monómeros y dímeros

35 Se realizó una electroforesis bidimensional en poli(acrilamida) como se describió antes en 2D-Electrophoresis, Principles and Methods (Amersham Biosciences). En resumen, se diluyeron 4 µg de IGIV total, fracciones monoméricas y diméricas de inmunoglobulinas (Ig) en 125 µl de cada uno de tampón de rehidratación que contenía urea 8 M, CHAPS al 2%, azul de bromofenol al 0.002%, DTT (0.65 mM) y tampón de IPG al 0.5%. Se rehidrataron tiras de 7cm de IPG pH 3-10 (Amersham Biosciences), durante la noche y se llevó a cabo el enfoque en una unidad IPGphor (Amersham Biosciences), según las especificaciones de las tiras (paso 1: constante 300 V/60 min, paso 2: gradiente a 1000 V/30 min, paso 3: gradiente a 5000 V/90 min, paso 4: constante 5000 V 15 min). Las tiras enfocadas se equilibraron en dos pasos de 15 minutos en tampón de equilibrado que contenía Tris-HCl 50 mM de pH 8.8, urea 6 M, glicerol al 30% (v/v), SDS al 2% (v/v), azul de bromofenol al 0.002% (v/v) y DTT 10 mg/ml (1^{er} equilibrado) o 25 mg/ml de yodoacetamida (2^{do} equilibrado). Para la separación por peso molecular, las tiras se enjuagaron en tampón de corrida dodecilsulfato de sodio (SDS) que contenía Tris(hidroximetil)-aminoetano (Merck) 2.5 mM, glicina (Merck) 25 mM, SDS al 0.01% (p/v) (Flucka) y se colocaron en un gel de poli(acrilamida) al 12%. Posteriormente, las tiras se recubrieron con un gel de apilamiento de poli(acrilamida) al 4% y la segunda dimensión se corrió en una cámara de electroforesis MiniProtean (BioRad) a una constante de 100 V durante aproximadamente 90 minutos. Se realizó tinción con plata usando el kit de tinción de plata PlusOne (Amersham Biosciences) .

50 Figura 8

Reactividad a la proteína M5 de *S. pyogenes* en fracciones de IGIV

55 ELISA: antígenos (proteínas M recombinantes humanas: M1, M3, M5, M6, M19,) recubiertas a 10 µg/ml. Bloqueo PBS/caseína 2 h 37 °C. Primer anticuerpo (IGIV T0/IGIV pH 4.0/dímeros/monómeros) a 10, 100 y 1000 µg/ml: 4 horas a 37 °C. Segundo anticuerpo: AP004 (sitio de unión) anti-IgG humana de oveja conjugada con peroxidasa, 1/1000 (2 h, 37 °C). Se muestran los resultados para M5, que es representativa de todas las otras proteínas M.

60 Figura 9

Actividad diferencial de la fracción dimérica sobre exoantígenos. La mayor actividad de la fracción dimérica se correlaciona con aumento de la afinidad de unión

65 Medidas de afinidad contra el toxoide tetánico y la proteína M1. Se evaluaron las afinidades de diferentes preparaciones de IGIV mediante monitoreo en línea usando el sistema de cubeta IAsys. Las cubetas se

inmovilizaron con 5 µg de proteína recombinante M1 de *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) o de toxoide tetánico. Para medir la asociación, las preparaciones de IGIV se diluyeron a diferentes concentraciones en PBS/Tween 20 al 0.05% y se agregaron en muestras de 50 µl a las cubetas. Las cubetas se lavaron con 3 x 50 µl de PBS/Tween 20 al 0.05% para el monitoreo de la disociación de los anticuerpos. Para la regeneración, las cubetas se lavaron secuencialmente 3 veces con 40 µl de HCl 20 mM durante 2 minutos y 45 µl de PBS/Tween 20 al 0.05%. Se calculó la K_D graficando los valores obtenidos de k_{on} para cada concentración de IGIV, monómeros o dímeros usando FASTplot y los programas Grafit.

ELISA: se analizaron IGIV, fracciones de monómeros y dímeros usando kits comerciales para toxoide tetánico, virus respiratorio sincicial (VRS) y *H. influenzae B* y los resultados se expresaron según las unidades/g de inmunoglobulinas (Ig) calculadas a partir de una curva estándar. Se tituló la actividad de la proteína M1 como se describe en la figura 7.

Figura 10

Los dímeros muestran una mayor actividad neutralizante frente a VRS en un ensayo de neutralización funcional utilizando células HEp-2

La acción neutralizante de diferentes preparaciones de IGIV (IGIV_{total} a pH 7 y a pH 4, monómeros a pH 4 y dímeros a pH 4) se diluyó previamente a 1.5 mg/ml y se diluyó en serie por duplicado en placas de 96 pocillos (Becton Dickinson, Meylan Cedex, FR). Después de agregar 50 µl de una fracción larga de VRS ($1/2 \cdot 10^5$ TCID₅₀/ml) a cada pocillo, las mezclas de anticuerpos-virus se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (en un agitador; sellado con parafilm). Todas las diluciones se realizaron en DMEM totalmente complementado. La cantidad de virus necesaria para el ensayo se definió previamente como la cantidad de partículas de VRS (500 TCID₅₀/ml) que producen 100% de muerte celular después de 3 días.

Se cultivaron células HEp-2 (ATCC CCL23) en placas de 96 pocillos (Becton Dickinson, Meylan Cedex, FR) y se cultivaron hasta 20'000 células/pocillo. Posteriormente, se extrajo el medio de cultivo y la mezcla de anticuerpos-virus previamente incubada se transfirió a las células HEp-2 y se incubó durante aproximadamente 72 horas a 37 °C en atmósfera humidificada.

Se extrajo el medio de cultivo celular de las células HEp-2 y las células se lavaron dos veces con PBS de pH 7.4. Las células se fijaron con metanol-acetona (relación 1:1, previamente enfriados a 4 °C) durante 10 minutos a 4 °C. Las células se lavaron nuevamente con PBS de pH 7.4. Se cubrieron con 50 µl de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-VRS marcado con FITC (Chemicon Europe LTD., Southampton, Reino Unido) por pocillo. El anticuerpo marcado se incubó durante 1 hora a 37 °C, en la oscuridad. El exceso de anticuerpo se lavó dos veces con PBS de pH 7.4 y una vez con H₂O destilada. Después de la tinción, se agregó una gota de líquido de montaje de fluorescencia (Chemicon Europe LTD., Southampton, Reino Unido) y la infección se visualizó con un aumento de 20x en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE300 Egg/ZH, CH). Las imágenes se capturaron con una cámara digital (Nikon, Digital Camera DXM1200, Egg/ZH, CH) utilizando un software de análisis de imagen (ACT-1, Nikon, Egg/ZH, CH).

Figura 11

Los dímeros mostraron mayor actividad en el péptido del bucle 2 del receptor muscarínico 3, un antígeno blanco del síndrome de Sjögren

Se compararon las preparaciones de IGIV (IGIV_{total} a pH 4 y pH 7, monómeros a pH 4 y dímeros a pH 4 en ELISA (como se describió antes para la figura 8) utilizando un péptido sintético que representa el bucle 2 de M3R.

Figura 12

Los dímeros muestran una mayor actividad preferencial sobre los autoantígenos intracelulares en comparación con los extracelulares

Los monómeros y los dímeros a pH 4 utilizados a una concentración de 100 µg/ml se compararon en ELISA (como se describió antes para la figura 8) usando antígenos que representan las proteínas intracelulares y extracelulares recubiertas a 10 µg/ml.

Figura 13

Los monómeros muestran una reactividad preferencial para los distintos serotipos de lipopolisacáridos (IATS) de *Pseudomonas aeruginosa*, en tanto se encontró lo inverso para la toxina A

Se analizaron los serotipos LPS de *Pseudomonas aeruginosa* (International Antigen Typing System) y la toxina A por ELISA estándar. Cada placa contenía diluciones seriadas de una preparación de anticuerpos de referencia

(plasma acumulado de 9 individuos inmunizados con una vacuna octovalente conjugada de O-polisacáridos toxina A de *Pseudomonas aeruginosa*) plasma de control y muestras de prueba (monómeros y dímeros). El anticuerpo de referencia se utilizó como base para la cuantificación de la cantidad anti-LPS o la concentración de anticuerpo IgG antitoxina A en el plasma de control y las muestras de prueba

5
Figura 14

Los dímeros mostraron mayor actividad sobre las proteínas citoesqueléticas

10 Inmunofluorescencia en células HEp-2

Para inmunohistología se incubaron 50 µl de IGIV, fracciones de Ig monomérica y dimérica en un kit de diagnóstico ANA (HEp-2 actina) (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, Estados Unidos) durante 30 minutos a 200 µg/ml, seguido de un paso de lavado en PBS de 5 minutos. Posteriormente, se incubó el conjugado anti-IgG humana FITC (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, Estados Unidos) durante 20 minutos, seguido de otro lavado en PBS de 5 minutos. Se adquirieron imágenes con un aumento de 400x en un microscopio de fluorescencia (Nikon E600, Eclipse), empleando el software ACT-1 (Nikon).

15
20 Figura 15

Los dímeros muestran mayor autorreactividad sobre las células HepG2

Se cultivaron células HepG2 (hepatoma) hasta confluencia en medio de cultivo DMEM complementado con FCS al 10%. Las células se tripsinizaron y lavaron dos veces con PBS, antes de la lisis. Las proteínas celulares se sometieron a precipitación con ácido tricloroacético listas para la 2D-PAGE posterior utilizando el mismo procedimiento descrito antes para la figura 7. Los geles bidimensionales resultantes (véase tinción con plata, Figura 1.a) se transfirieron a nitrocelulosa, se bloquearon con PBS que contenía 0.15% de caseína y se incubaron durante la noche a 4 °C con fracciones monomérica (fig. 1.b) o dimérica (fig. 1.c) de IgG a 10 µg/ml. Se realizó el desarrollo usando un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina 1: 1000 en PBS-caseína (0.15%) y un kit de desarrollo de fosfatasa alcalina (BioRad Inc.)

25
30
35 Figura 16

Los dímeros muestran mayor actividad sobre las proteínas intracelulares de células epiteliales de diferentes especies animales

Análisis FACS de células epiteliales de mono (COS-7), humanas (G2-HEP, HEp-2) y de hámster (CHO). Se utilizaron células de leucemia basófila de rata de tipo salvaje (RBL wt) como células no-epiteliales de control (no se muestran los perfiles FACS).

40
45
50 Para la citometría de flujo todas las líneas de células adherentes se separaron con PBS-EDTA al 0.03% (p/v), se fijaron con paraformaldehído al 1% (v/v) en PBS-caseína al 0.15% (p/v) (Sigma, Buchs, Suiza) y se permeabilizaron con saponina al 0.3% (Sigma, Buchs, Suiza) (p/v) en PBS-caseína al 0.15% (p/v). Se realizó la tinción indirecta en un procedimiento multipasos por duplicado: (1) incubación de células no-permeabilizadas o permeabilizadas durante 20 minutos con 50 µg de IGIV, fracciones monomérica o dimérica de Ig en PBS-caseína al 0.15% (p/v) o PBS-caseína al 0.15%/saponina al 0.3% (ambos p/v), respectivamente. (2) Incubación con anti-IgG-FC humana de oveja específica del isotipo marcada con FITC (PFO04, The Binding Site, Birmingham) durante 20 minutos. Ambas incubaciones fueron seguidas de dos pasos de lavado en PBS de 5 minutos. La adquisición de datos de citometría de flujo se realizó en un equipo FACSCalibur usando software Cell Quest Pro (ambos Becton-Dickinson), y para el análisis de datos posterior se empleó el software WinMDI (© Joseph Trotter).

Tabla 1

Reactividad diferencial de las fracciones monomérica y dimérica separadas sobre los antígenos seleccionados					
Exoantígenos	Fracciones de inmunoglobulina		Autoantígenos	Fracciones de inmunoglobulina	
	Monómeros	Dímeros		Monómeros	Dímeros
Toxoide tetánico ^{ab}	+	++	Miosina ^b	+	++
Toxoide diftérico ^a	+	+	Fosforilasa B ^b	+	++
Campylobacter jejuni ^a	+	+	Fibronectina ^b	-	-
E. coli ^a	+	+/-	α2-macroglobulina ^b	+	+
Bacteriófago ^a	+	+	Proteína C-reactiva ^a	+	+
KLH ^{ab}	+	+	IgE, IgA, IgM ^a	+/-	+/-
Seroalbúmica bovina ^a	+/-	+/-	Seroalbúmina humana ^a	-	-
Estreptavidina ^a	-	-	Eritropoyetina ^a	-	-
			FcεRI-cadena ^a	+/-	+/-
			C1q ^a	+	+

Resumen de los resultados de inmunodot inmunoblot^a y ELISA^b.

- 5 Inmunodots: se dejaron secar los puntos con 10, 100 y 500 ng de antígeno. Bloqueo: Bloque superior, 1.5 h, temperatura ambiente (RT). Primer anticuerpo (dímeros/monómeros) a 10, 100 y 500 µg/ml: durante la noche a 4 °C. Segundo anticuerpo: AP004 (sitio de unión) anti-IgG humana de oveja conjugada con peroxidasa (2 h, RT).

Reactividades:

- 10 + reacción fuerte de preparaciones de inmunoglobulinas de 100 µg/ml en puntos de 10 ng de antígeno
 +/- reactividad débil de preparaciones de inmunoglobulinas de 500 µg/ml en puntos de 500 ng de antígeno
 - sin reactividad de preparaciones de inmunoglobulinas de 500 µg/ml en puntos de 500 ng de antígeno
 ELISA: antígenos recubiertos a 10, 1 µg/ml. Bloqueo PBS/caseína 2 h 37 °C. Primer anticuerpo
 (dímeros/monómeros) a 10, 100 y 1000 µg/ml: 4 horas a 37 °C. Segundo anticuerpo: AP004 (sitio de unión) anti-IgG
 15 humana de oveja conjugada con peroxidasa, 1/1000 (2 h, 37 °C).

Reactividades: comparación de la reactividad a 10 µg/ml de antígeno con fracciones de inmunoglobulinas de 100 µg/ml. ++ el título de la señal de los dímeros es al menos un log más que los monómeros, + señal clara sobre fondo, +/- señal débil pero aún por encima del fondo, - no hay señal.

20

Ejemplos

Hemos investigado las reactividades diferenciales de las fracciones monomérica y dimérica encontradas en preparaciones de IGIV. Hemos utilizado una preparación liofilizada que se solubilizó según las instrucciones para uso clínico *in vivo*. Esta inmunoglobulina intravenosa, también denominada SAGL, (forma abreviada de Sandoglobulina) se repartió en alícuotas y se almacenó a -20 °C para experimentos adicionales. Esta IGIV se utilizó como referencia en todos los otros ensayos y para establecer las condiciones para la separación de las fracciones monomérica y dimérica. Nuestros resultados indican un patrón de reactividad diferencial de estas fracciones contra autoantígenos y exoantígenos lo que ha sido confirmado mediante diversas técnicas.

30

1) Aislamiento de las fracciones monomérica y dimérica de IGIV:

Para optimizar el fraccionamiento probamos varios tipos de columnas diferentes (Sephacryl, Superose, ReproSil) y diferentes condiciones (tampones, velocidades de flujo, tamaño de las columnas). La Sephacryl S-300, un sistema de HPLC semi-preparativa, combinó buena separación de picos, alta pureza de las fracciones, tiempos de corrida cortos y altas concentraciones de proteínas en las fracciones, véanse las figuras 1 y 2. Las fracciones separadas se analizaron inmediatamente por HPLC, como se muestra en la figura 3. De acuerdo con informes anteriores observamos que los dímeros demuestran una inestabilidad dinámica (es decir, tienden a volver a la forma monomérica) influenciada por tampón, pH, temperatura, concentración de proteínas y tiempo de almacenamiento. La figura 4 muestra la cinética de la descomposición de la fracción de dímeros separada cuando se almacena a temperatura ambiente. La IgG dimérica se redujo en horas a una población dimérica más estable, rango 20-30% de los dímeros originales. En general, la formación de dímeros es lenta, mientras que su descomposición es más rápida. En cambio la fracción monomérica es estable durante varias semanas y no vuelve a formar dímeros.

45

2) Elaboración de una preparación de dímeros disociados:

Con el fin de producir una fracción dimérica que sea dinámicamente estable y que imitaría la disociación *in vivo* de los dímeros una vez inyectados, se usó una fracción dimérica disociada que es efectivamente transformada en sus componentes monoméricos. La condición de pH óptimo se probó diálizando los dímeros y los monómeros (con fines de control) contra tampones a valores de pH que variaron entre 4 y 7. La diálisis fue seguida inmediatamente de análisis de HPLC de las fracciones dializadas. Como se muestra en la figura 6 el pH óptimo para la disociación de los dímeros fue pH 4 (que dejó el contenido de dímeros reducido a menos del 10%) mientras que la diálisis a pH 5 y 7 dejó un contenido de dímeros de 39.41% y 55.19%, respectivamente. La fracción de monómeros es extraordinariamente estable a todas las condiciones de pH probadas. Esto significa que la fracción dimérica se separa mediante exclusión por tamaño seguida de un tratamiento (en nuestro ejemplo utilizamos una diálisis en ácido acético a pH 4.0) para convertir la IgG dimérica en monómeros. Esto requirió un mínimo de 24 h de diálisis en ácido acético 10 mM de pH 4.0. Después esta preparación de dímeros disociados que contenía menos de 5% de dímeros, siguió siendo dinámicamente estable y no volvió a convertirse en dímeros en las condiciones definidas de almacenamiento y uso. Además, la neutralización de los dímeros disociados a pH 7.4 en tampón PBS no tuvo efecto sobre el % de dímeros después de hasta 24 h de almacenamiento a temperatura ambiente. Por lo tanto mientras se mantengan las condiciones del ensayo utilizadas para evaluar la reactividad, los dímeros disociados permanecerán disociados. Para permitir una comparación igual de monómeros y dímeros los monómeros también se sometieron al mismo tratamiento y se compararon en el mismo sistema tampón. En la figura 5 se muestra un ejemplo de un diagrama de flujo optimizado para la separación y preparación de las diferentes fracciones utilizadas.

3) Caracterización de las preparaciones monomérica y de dímeros disociados

Ambas fracciones mostraron los patrones globales esperados para cadenas pesadas y ligeras en la electroforesis en gel 2D. La fracción dimérica mostró una tendencia a una distribución isoelectrica más amplia que se extendía más en la región ácida, Figura 7. El análisis comparativo de isotipos mostró una distribución igual de IgG1, 2, 4 y ligeramente aumentada de IgG3 en las fracciones diméricas.

4) Reactividades diferenciales de las preparaciones monoméricas y de dímeros disociados

Se llevaron a cabo reactividades a exoantígenos y autoantígenos en una serie de ensayos diferentes. En resumen, la fracción dimérica muestra una mayor reactividad a ciertos antígenos tanto autoantígenos como exoantígenos. En algunos casos también hemos medido la afinidad de la reacción, que aumentó claramente en los dímeros. No hemos encontrado una especificidad antigénica donde la reactividad sólo esté presente en los monómeros o en los dímeros. Existen antígenos en los que no se detectó ninguna reactividad de anticuerpo en los monómeros ni en los dímeros.

La figura 8 muestra resultados de un ELISA usando la proteína M5 recombinante humana (factores de virulencia) de *Streptococcus pyogenes*. Los dímeros muestran una reacción claramente potenciada en comparación con los monómeros o las preparaciones de IGIV definidas como T0 (IGIV preparada y congelada en el tiempo cero) o IGIV definida como pH 4.0 (IVIG dializada en el mismo tampón que los dímeros).

La figura 9 muestra resultados para los exoantígenos toxoide tetánico, M1 de *S. pyogenes*, VRS y *H. influenzae B*. Los dímeros muestran claramente reacciones potenciadas, confirmadas por mediciones de afinidad, excepto para *H. influenzae B* que muestra igual reactividad en ambas fracciones.

La figura 10 muestra la mayor actividad anti-VRS en los dímeros en comparación con los monómeros. Se evaluó la acción neutralizante de IGIV no separada a pH 7 y a pH 4, monómeros a pH 4 y dímeros a pH 4. Estas cuatro fracciones IGIV se titularon para determinar la concentración de IgG a la cual >90% de las células HEp-2 estaban protegidas de la infección. La detección de la infección por el VRS de las células HEp-2 fue claramente indicada por tinción de inmunofluorescencia (Figura 10). Se observó una dependencia clara de la dosis que varía de acuerdo con la fracción de IGIV ensayada. La diferencia más notable en la actividad neutralizante se vio en una comparación de monómeros y dímeros a pH 4. Significativamente más monómeros (187 µg/ml) que dímeros (46.8 µg/ml) fueron necesarios para una neutralización de 100% de la misma cantidad de partículas de VRS.

La figura 11 muestra una mayor actividad en los dímeros en comparación con los monómeros contra un péptido M3R, uno de los antígenos blanco del síndrome de Sjögren. Los autoanticuerpos contra el M3R están presentes en las preparaciones de IGIV, más particularmente en los dímeros disociados lo que sugiere la presencia de un control antiidiotípico de dichos autoanticuerpos en condiciones fisiológicas normales.

La figura 12 muestra una reactividad preferencial de los dímeros sobre los autoantígenos ubicados en el compartimiento intracelular en comparación con los autoantígenos extracelulares.

La figura 13 muestra un claro aumento de la actividad de los monómeros contra los diversos serotipos de lipopolisacáridos (representados por la clasificación IATS) de *Pseudomonas aeruginosa*. En comparación, los dímeros mostraron una mayor actividad contra la proteína, toxina A.

La figura 14 muestra resultados que usan las células HEp-2 para el análisis inmunohistológico. Estas células son utilizadas rutinariamente por los laboratorios de diagnóstico para detectar autoanticuerpos, encontrados en varias enfermedades autoinmunitarias que reaccionan con una variedad de antígenos nucleares, ribosómicos y mitocondriales. No se vio ningún patrón patológico de reactividad. En cambio hubo una marcada actividad de la fracción dimérica que a mayor aumento se vio como componentes del citoesqueleto de la célula.

La figura 15 confirma resultados observados previamente por inmunofluorescencia en células HEp-2 (epiteliales). Esta figura muestra un análisis 2D del proteoma de células HepG2 seguido de inmunotransferencia Western usando cualquiera de las fracciones monoméricas o diméricas. Se observa un aumento de la autorreactividad en la fracción dimérica en comparación con la monomérica. Este incremento en la reactividad se debe a un subconjunto restringido e inmunodominante distinto de autoantígenos según se determina recogiendo la mancha y analizándola por espectrometría de masa.

La figura 16 muestra los resultados del análisis FACS sobre diferentes tipos de células epiteliales. Las células no se trataron o se trataron, es decir se permeabilizaron para permitir la distinción entre la coloración de la membrana e intracelular, respectivamente. Los dímeros muestran mayor reactividad intracelular para todas las células epiteliales analizadas. No se observó ninguna coloración significativa sobre el fondo para las células no-permeabilizadas lo que indica una falta de reactividad con las proteínas de la membrana para todas las fracciones analizadas. En contraste las células RBL sin tratar utilizadas como línea celular no epitelial de control (no se muestra el perfil) mostraron igual coloración por todas las fracciones lo que probablemente representa la interacción con los receptores Fc-gamma.

La tabla 1 representa datos acumulados de ensayos ELISA e Inmunodot donde los antígenos respectivos se inmovilizan y se permite que reaccionen con un rango de concentración de monómeros dímeros y preparación de partida de IGIV como control. Para permitir una comparación conveniente los monómeros y dímeros se compararon en una escala de reactividad simple (++ a -). Se observan claramente reactividades diferenciales entre monómeros y dímeros. También parece que algunos autoantígenos por ejemplo miosina y fosforilasa B, si bien reaccionan con los monómeros también muestran una mayor reactividad con los dímeros.

Resumen

Basado en los resultados anteriores, la fracción dimérica contiene el repertorio de anticuerpos más maduro y muestra notable actividad contra autoantígenos intracelulares. En cambio la fracción monomérica, que consiste en anticuerpos inmunes y naturales, puede reaccionar preferentemente con algunos antígenos polisacáridos.

La fracción dimérica contiene anticuerpos de mayor afinidad y por lo tanto esta fracción también sería biológicamente más activa por ejemplo neutralizando la actividad en el caso del anticuerpos antibacterianos, antitoxinas o antivirales. Por lo tanto la fracción dimérica representa una subfracción de IGIV con una mayor actividad específica a ciertos antígenos. Esto también explicaría la presencia de anticuerpos antiidiotipos en esta fracción, ya que el sistema inmunitario tiene que responder a los anticuerpos de alta afinidad que se producen por una retroinhibición o un descenso regulado para mantener la homeostasis.

La fracción monomérica contiene los anticuerpos de menor afinidad que proporcionan los anticuerpos naturales, es decir, el repertorio básico del cual se deben desarrollar los anticuerpos de alta afinidad.

References

1. Coutinho, A., M.D. Kazatchkine, and S. Avrameas, Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol*, 1995. 7(6): p. 812-8.
2. Kazatchkine, M.D. and S.V. Kaveri, Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N Engl J Med*, 2001. 345(10): p. 747-55.
3. Cohen, I.R., The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol Today*, 1992. 13(12): p. 490-4.
4. Haeney M. Intravenous immune globulin in primary immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*, 1994, 97: p. 11-15.
5. Sewell, W.A. and S. Jolles, Immunomodulatory action of intravenous immunoglobulin. *Immunology*, 2002. 107(4): p. 387-93.
6. Rossi, F., G. Dietrich, and M.D. Kazatchkine, Anti-idiotypes against autoantibodies in normal immunoglobulins: evidence for network regulation of human autoimmune responses. *Immunol Rev*, 1989. 110: p. 135-49.
7. Vassilev, T.L., et al., Variable region-connected, dimeric fraction of intravenous immunoglobulin enriched in natural autoantibodies. *J Autoimmun*, 1995. 8(3): p. 405-13.
8. Simon, H.U. and P.J. Spath, IVIG-mechanisms of action. *Allergy*, 2003. 58(7): p. 543-52.
9. Ginaldi, L., et al., The immune system in the elderly: activation-induced and damage-induced apoptosis. *Immunol Res*, 2004. 30(1): p. 81-94.
10. Lacroix-Desmazes, S., et al., Analysis of the natural human IgG antibody repertoire: life-long stability of reactivities towards self antigens contrasts with age-dependent diversification of reactivities against bacterial antigens. *Eur J Immunol*, 1995. 25(9): p. 2598-604.
11. Tankersley, D.L., Dimer formation in immunoglobulin preparations and speculations on the mechanism of action of intravenous immune globulin in autoimmune diseases. *Immunol Rev*, 1994. 139: p. 159-72.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la fabricación de una composición farmacéutica que comprenda una fracción de anticuerpos humanos de una población heterogénea de donantes humanos, que consiste en:
- 5 (a) someter una preparación de anticuerpos humanos de una población heterogénea de donantes a un fraccionamiento por tamaño,
(b) recuperar la fracción de anticuerpos diméricos, y
(c) monomerizar los anticuerpos diméricos con un peso molecular aparente de aproximadamente 300 kDa.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, donde el paso (a) comprende: separación de exclusión por tamaño, filtración en gel, ultrafiltración y otros métodos de separación en gel o membrana.
3. El método de la reivindicación 1, donde el paso (b) comprende ajustar a un pH ácido.
- 15 4. El método de la reivindicación 3, donde el pH ácido está en el rango de aproximadamente 3 a aproximadamente 5.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual la preparación de anticuerpos humanos es una preparación de inmunoglobulinas policlonales.
- 20 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la fracción de anticuerpos humanos es una fracción de anticuerpos diméricos de una preparación intravenosa de inmunoglobulinas humanas policlonales (IGIV).
- 25 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la pureza de los anticuerpos diméricos es de al menos 75%, preferentemente de al menos 80% y más preferentemente de al menos 85%.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el contenido de dímeros en el paso (c) es 10% o menos.
- 30 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual los anticuerpos del paso (c) tienen una actividad específica al menos dos veces mayor contra el toxoide tetánico o el virus respiratorio sincicial y contra la proteína de virulencia M de *S. pyogenes* o las células epiteliales Hep-2 respecto a la preparación de inmunoglobulinas no fraccionadas.
- 35 10. La composición farmacéutica obtenible por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 para uso médico.
- 40 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 destinada al tratamiento de infecciones, por ejemplo infecciones virales, bacterianas, fúngicas, protozoarias o parasitarias.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 destinada al tratamiento de infecciones agudas.
- 45 14. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 destinada al uso en el tratamiento de los trastornos autoinmunitarios.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 destinada al uso en el tratamiento del síndrome de Sjögren.
- 50 16. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 destinada al uso en el mantenimiento o la restauración de la homeostasis autoinmunitaria.

Figura 1

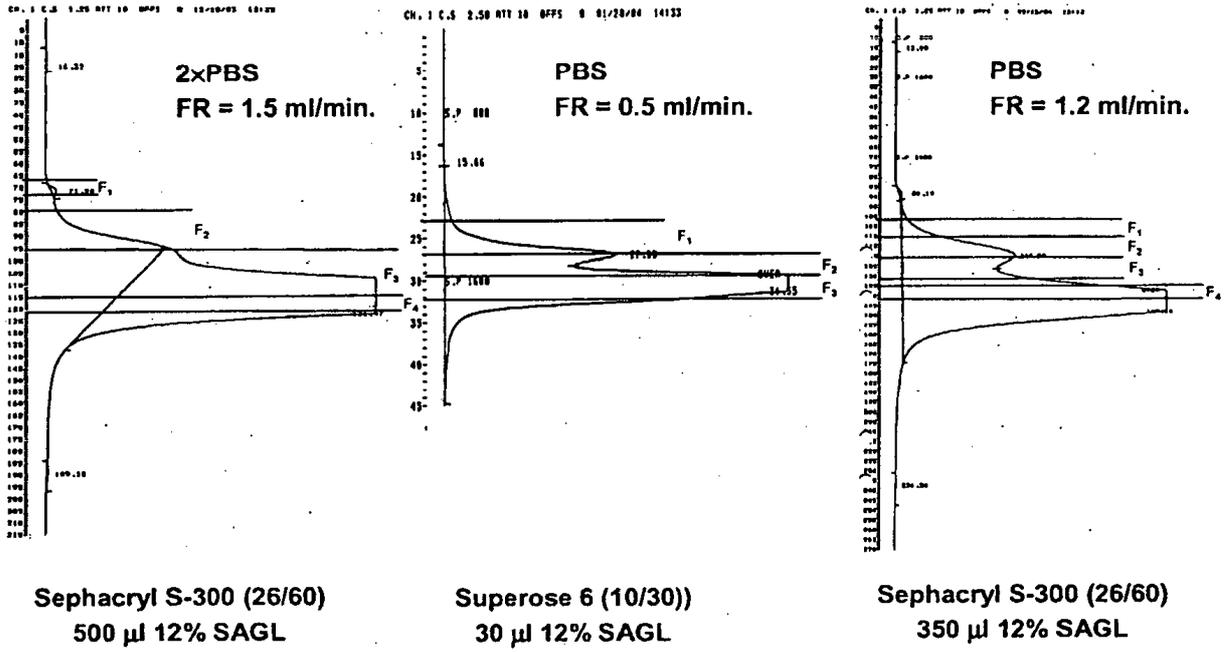


Figura 2

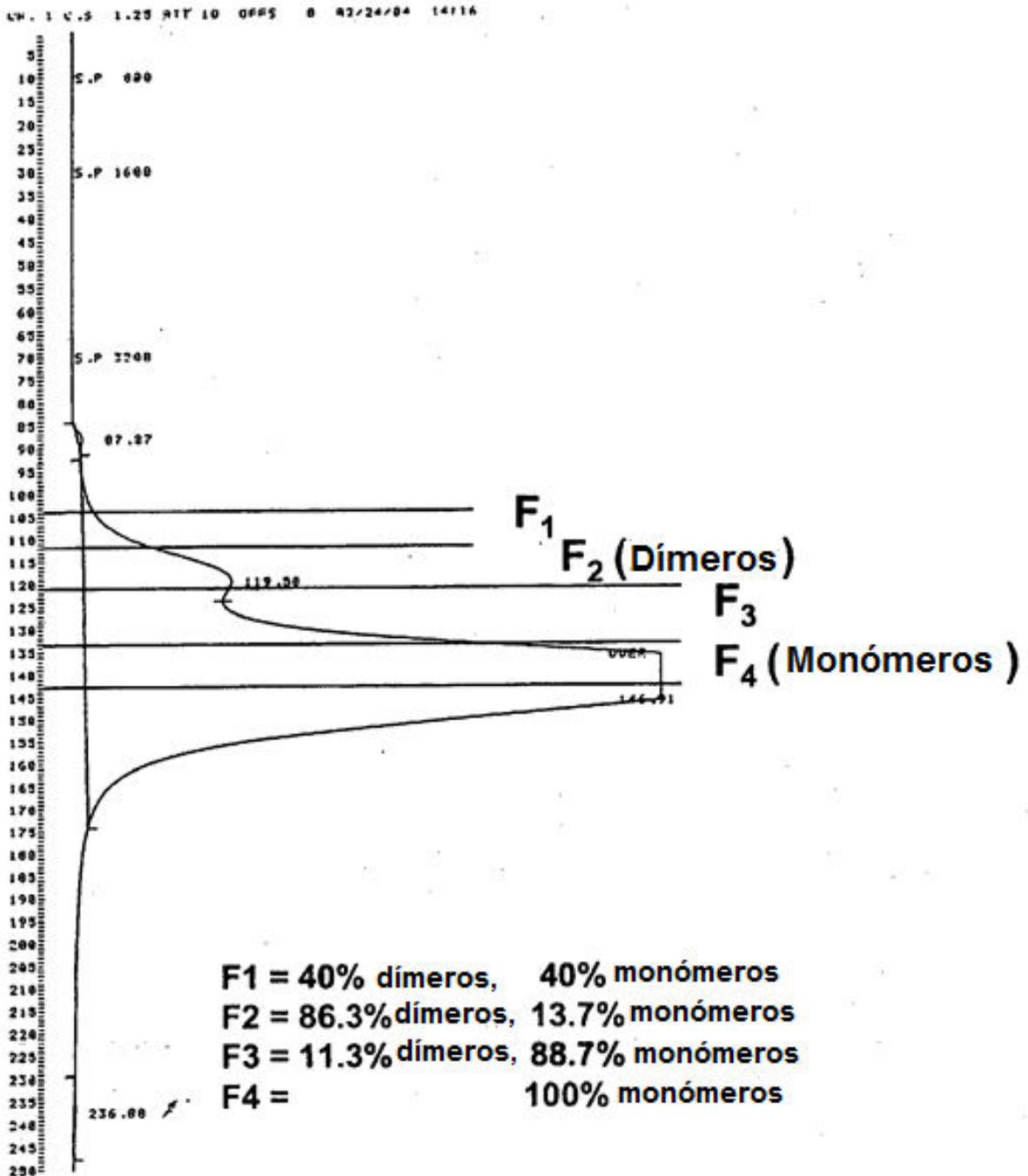


Figura 3

Perfiles de HPLC de fracciones de IGIV

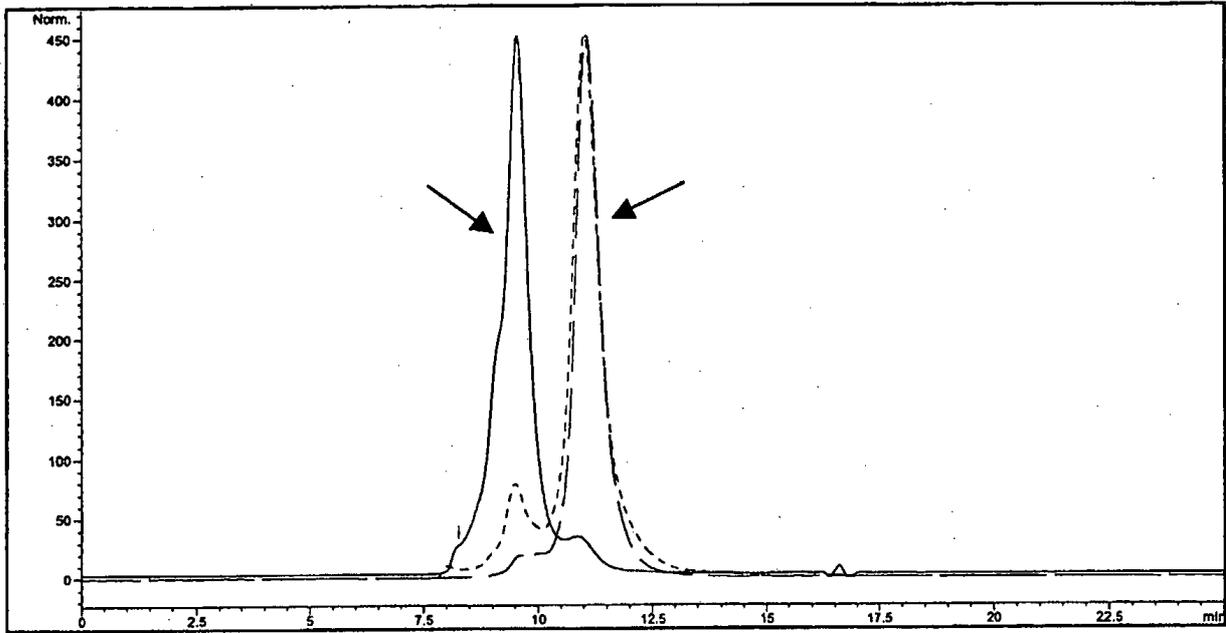


Figura 4

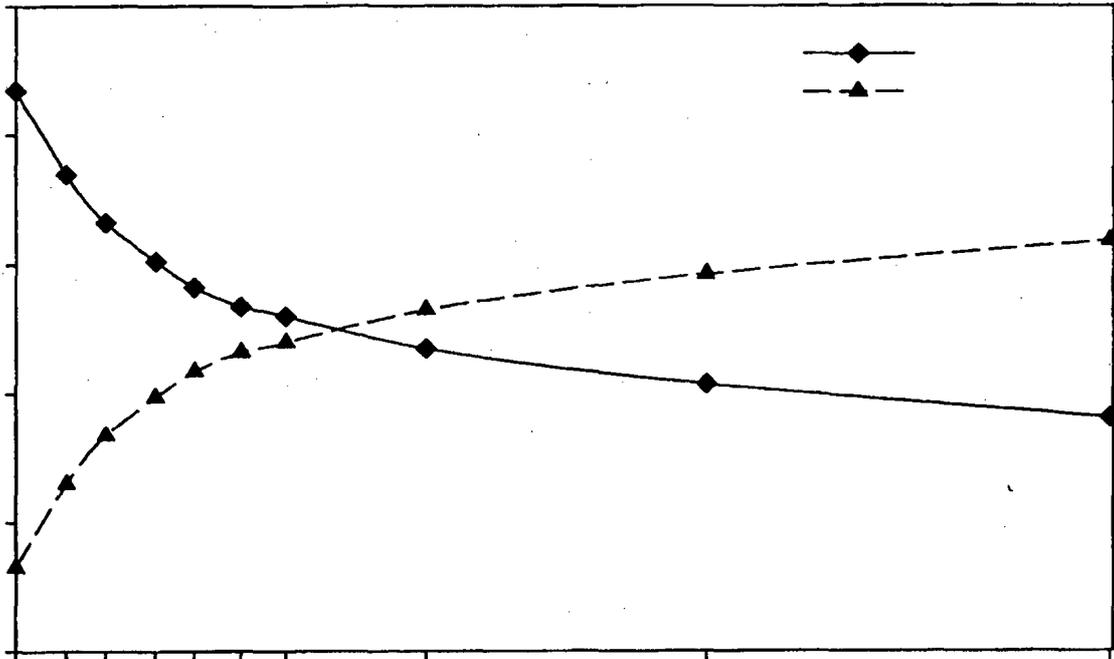


Figura 5

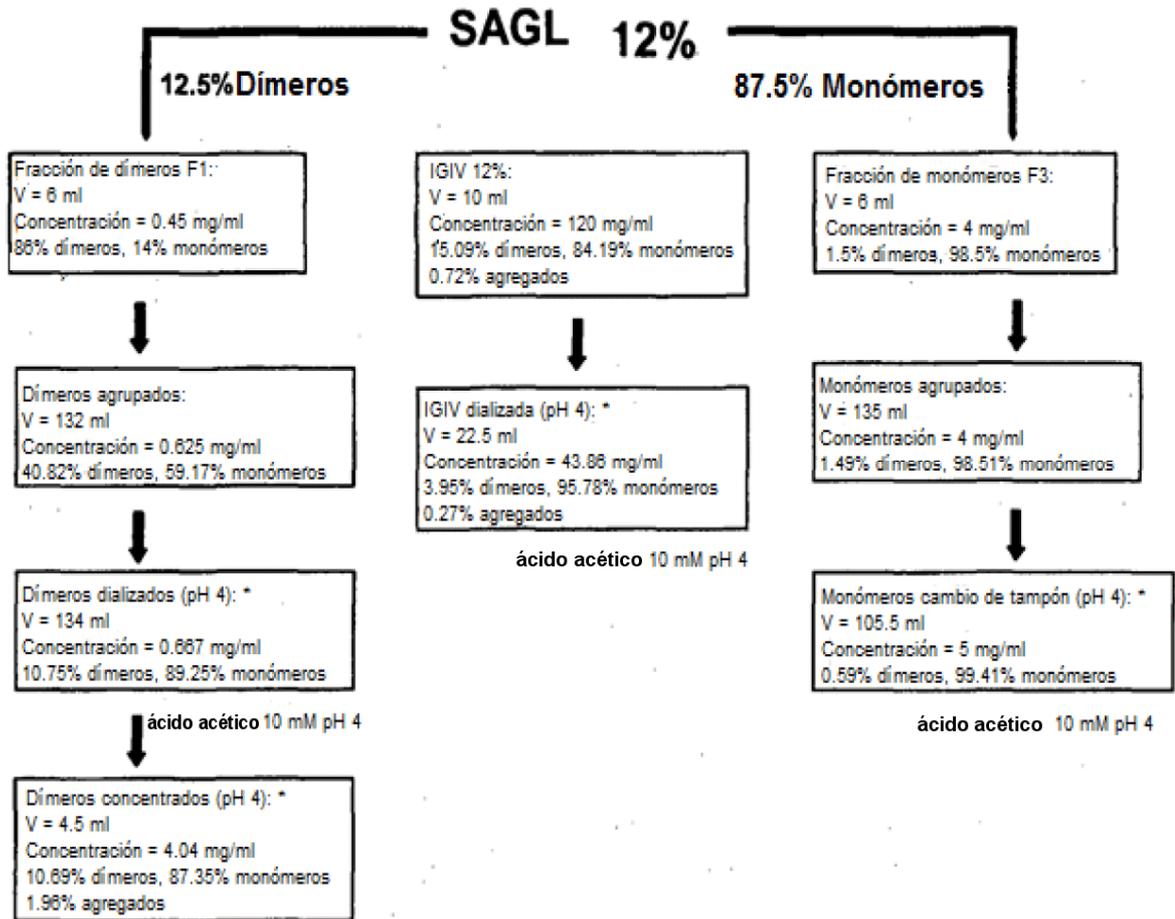


Figura 6

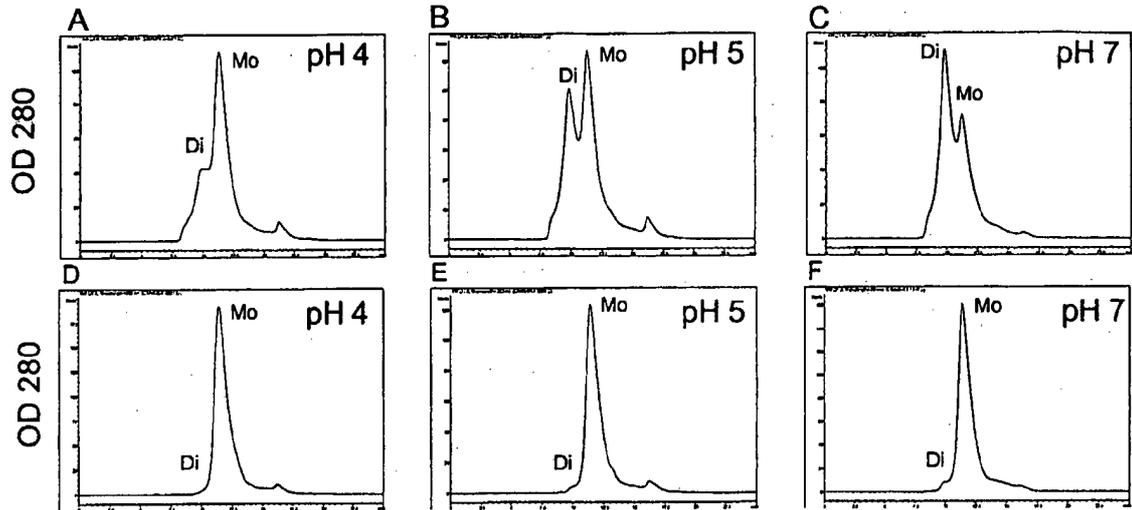


Figura 7

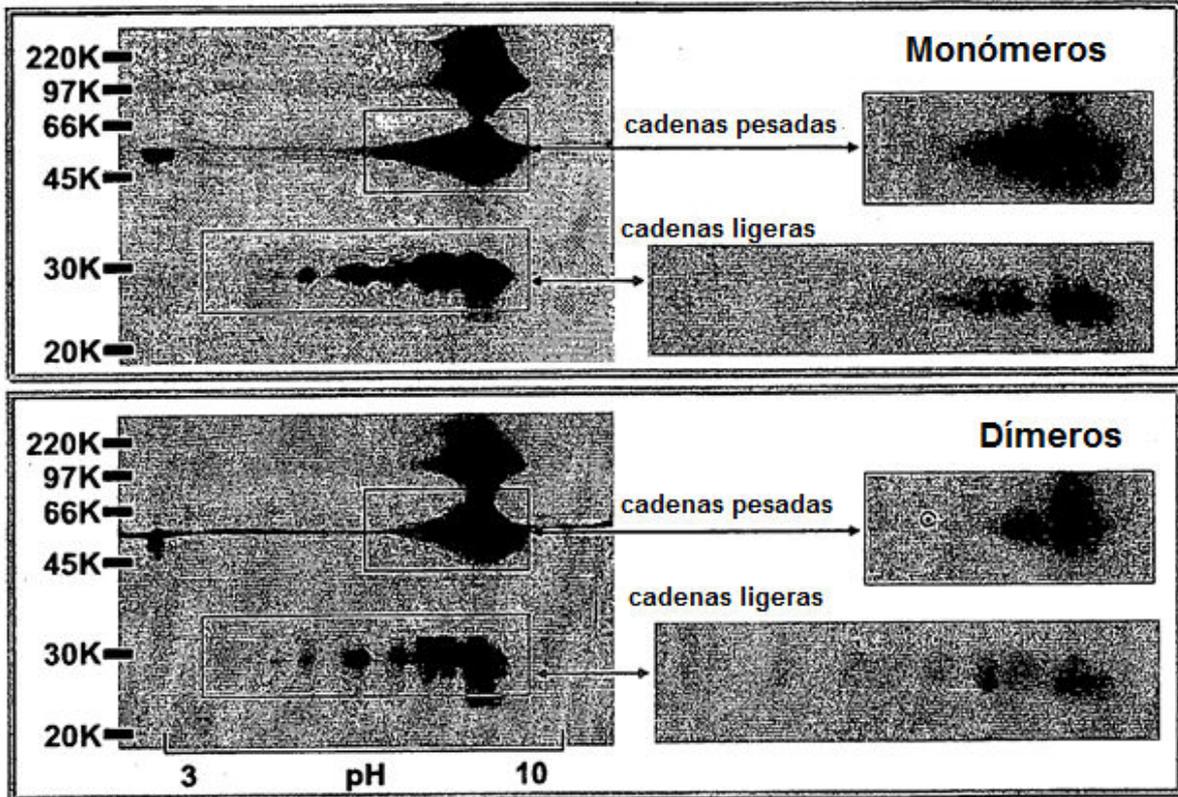


Figura 8

Reactividad a la proteína M5 de *S. pyogenes* en fracciones de IGIV

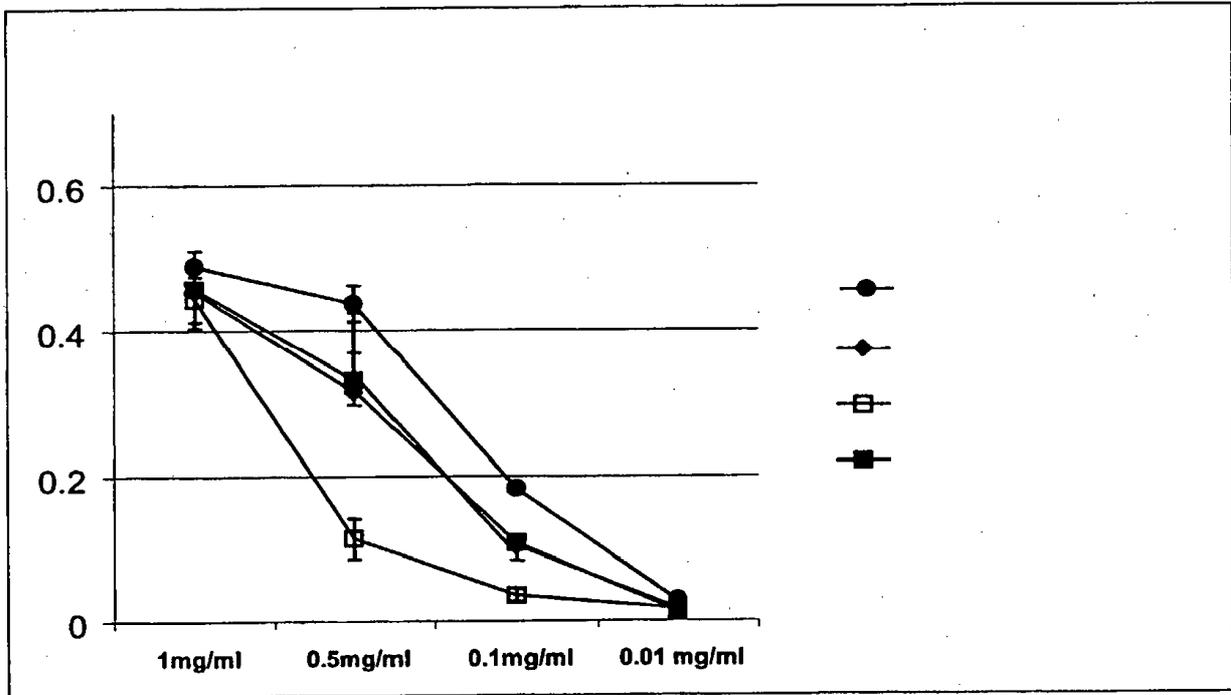


Figura 9

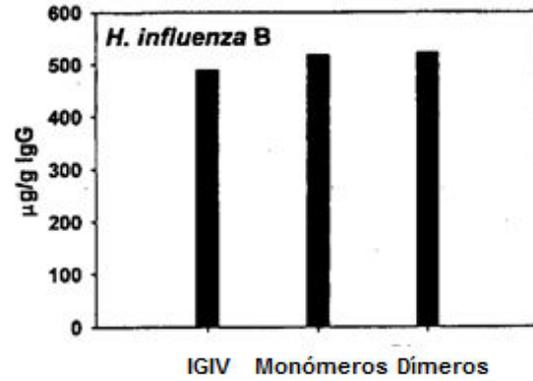
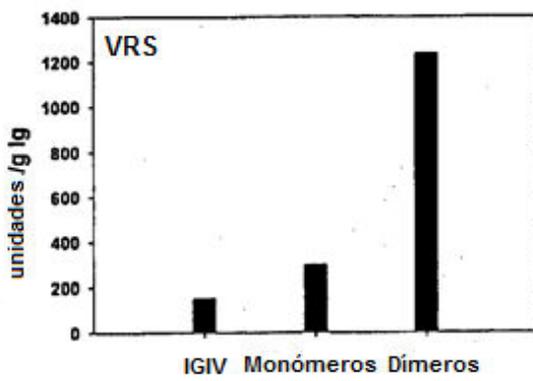
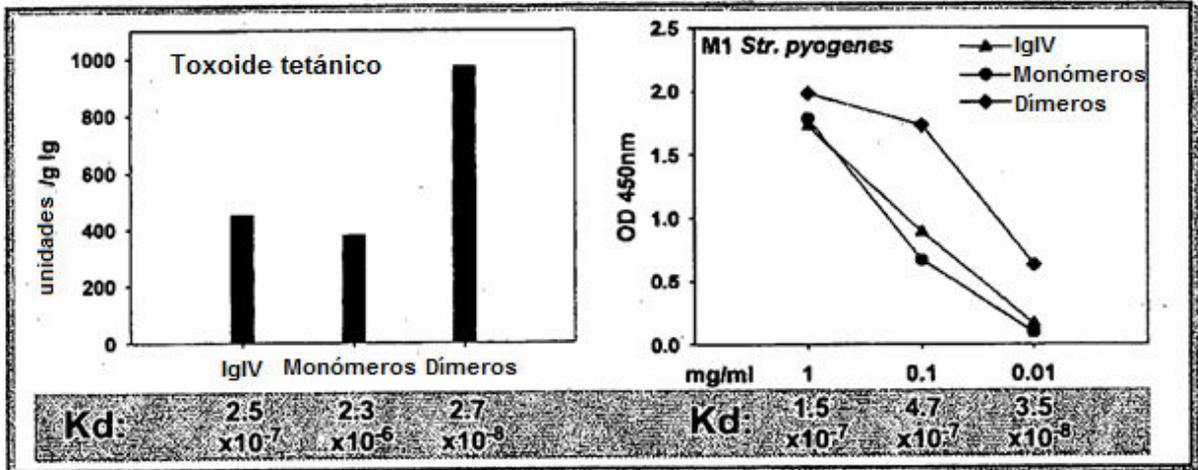


Figura 10

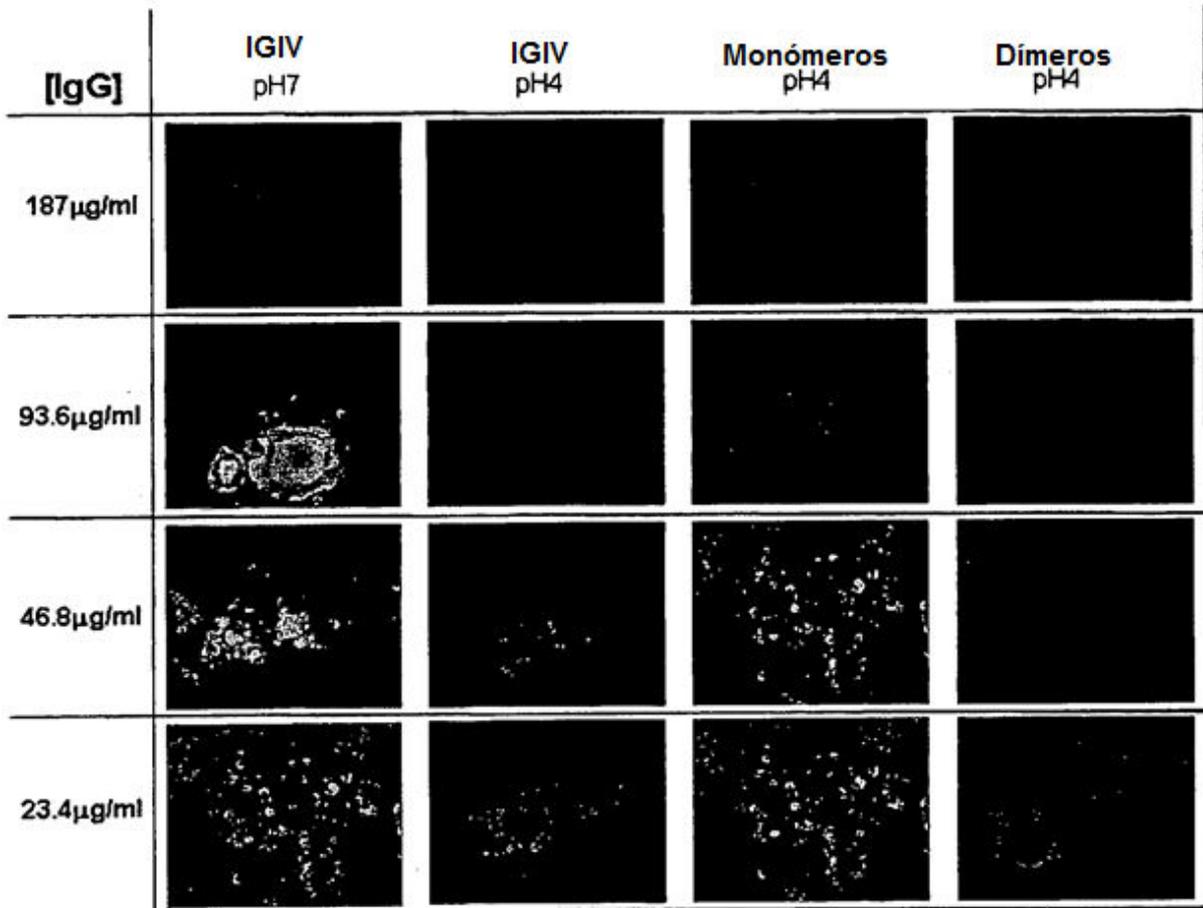


Figura 11

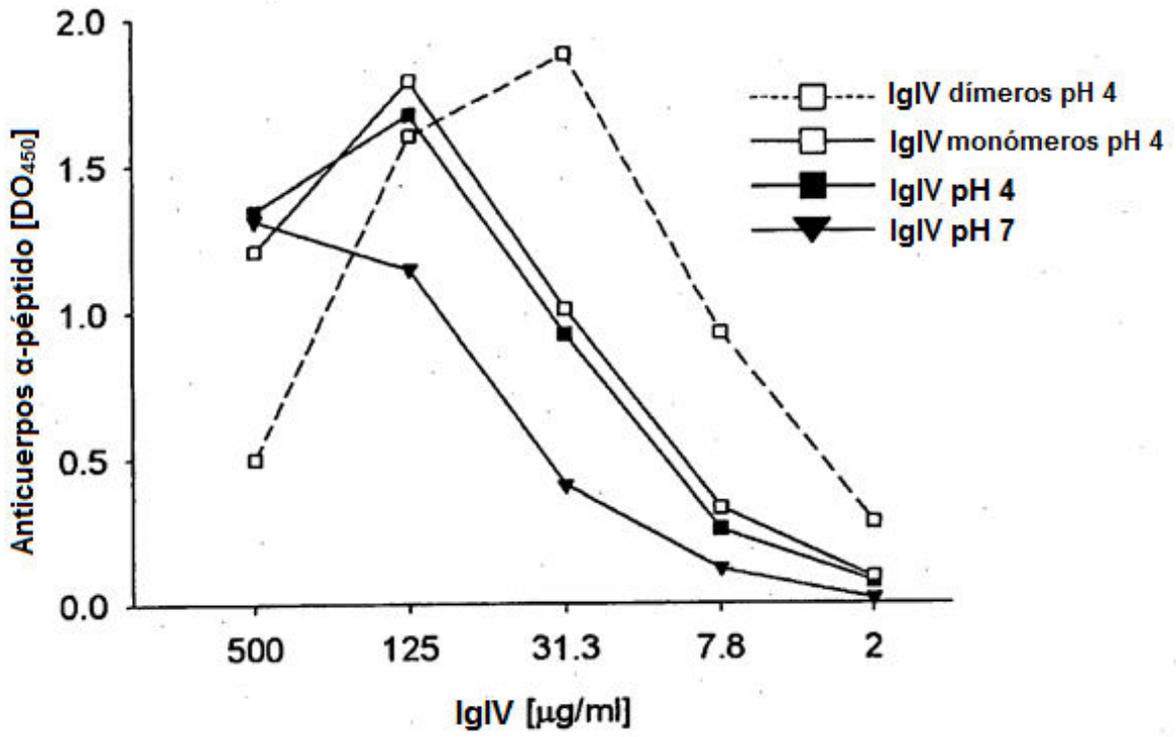


Figura 12

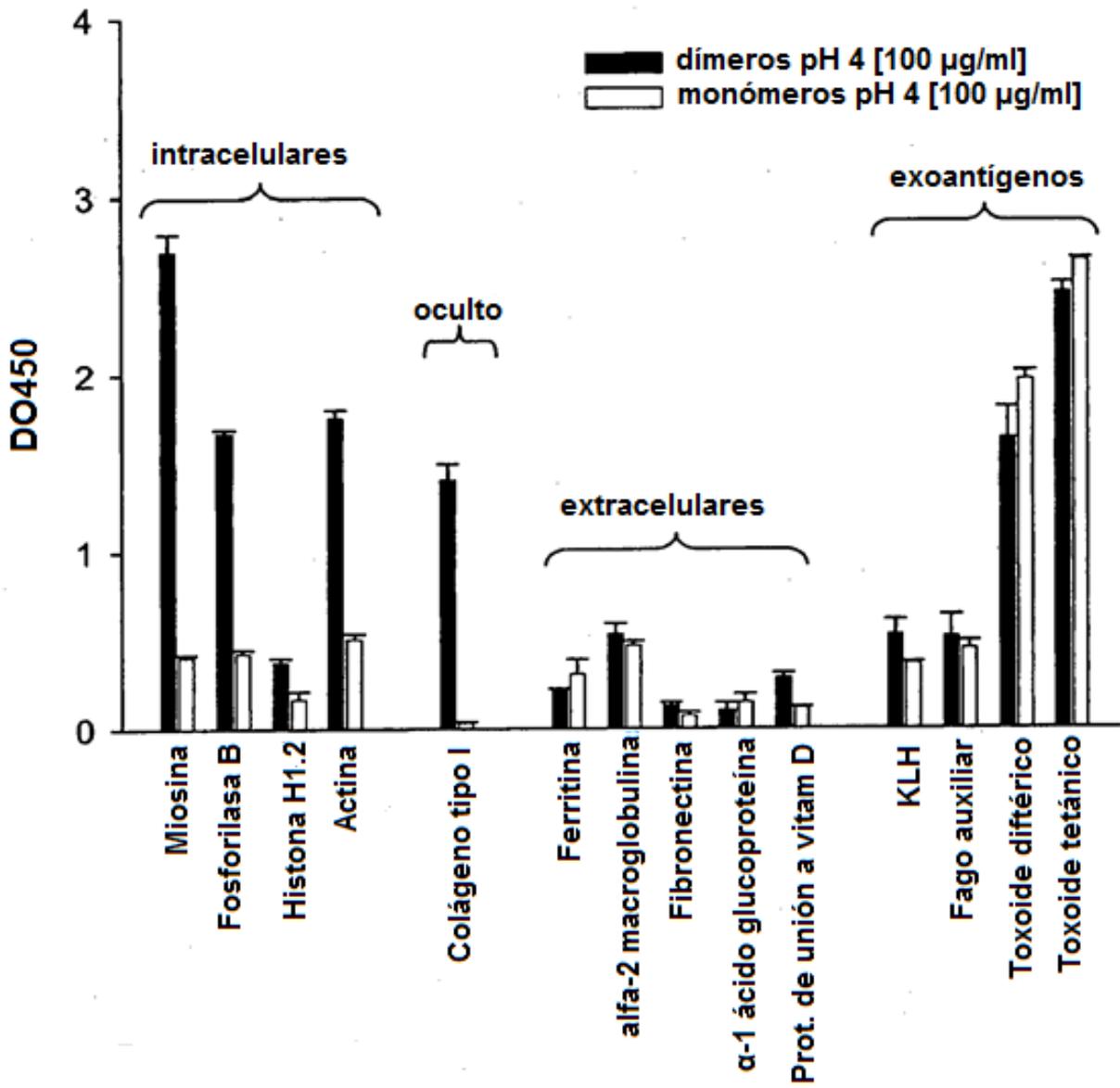


Figura 13

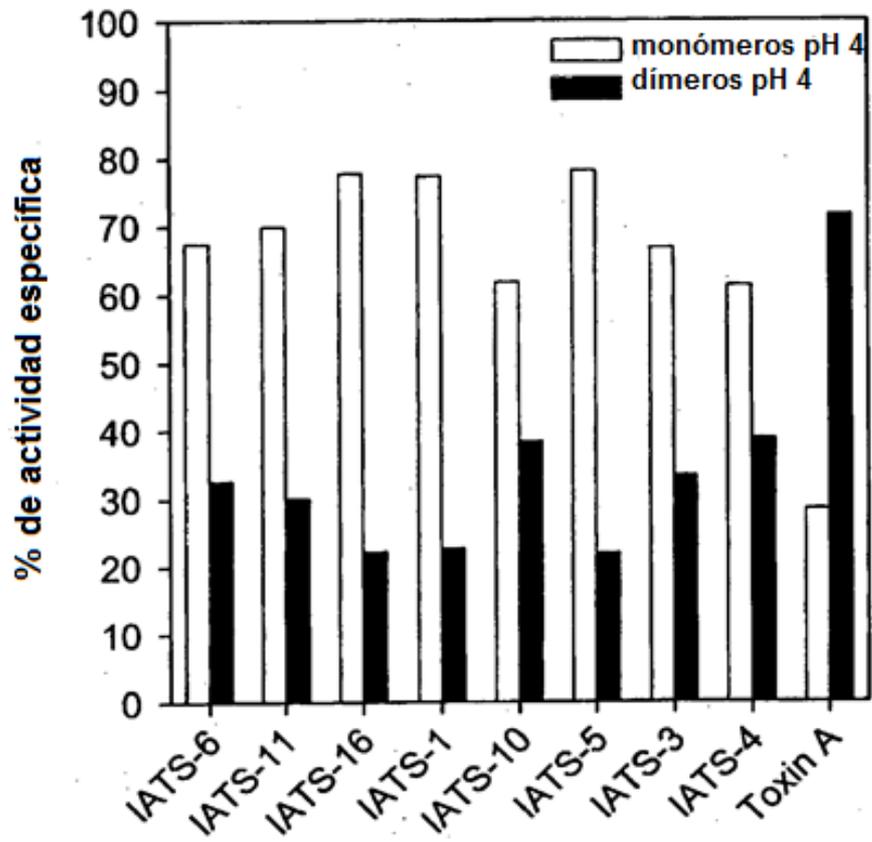


Figura 14

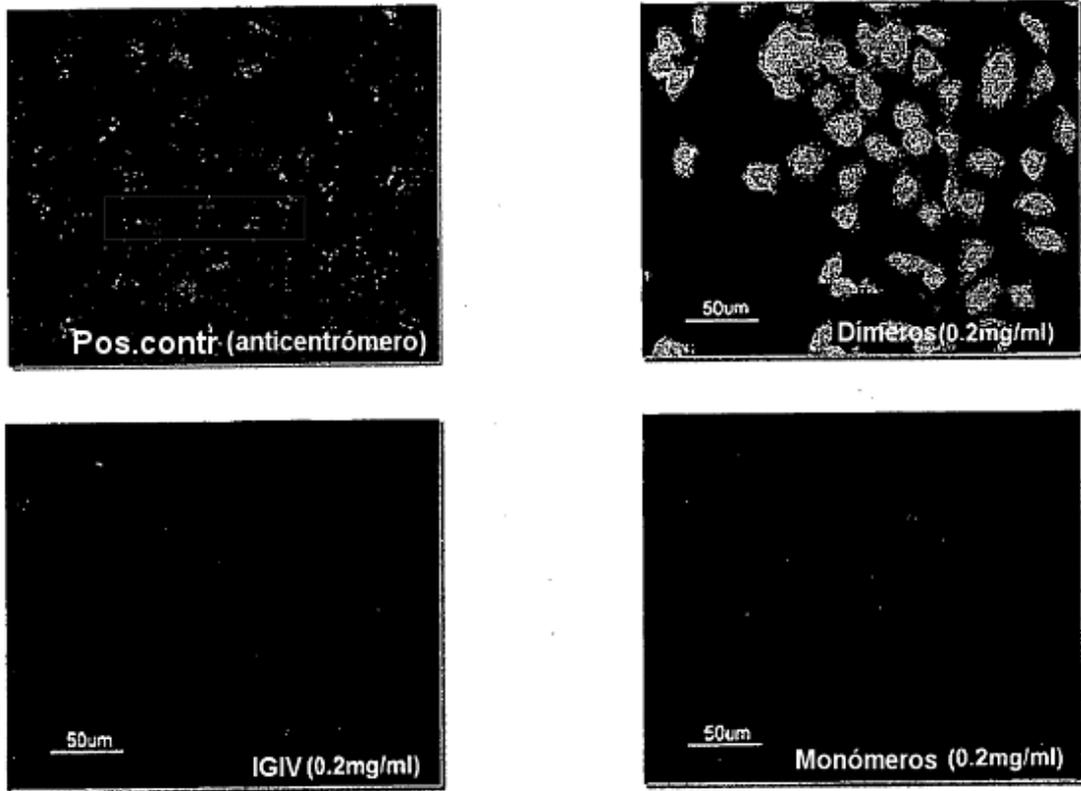


Figura 15

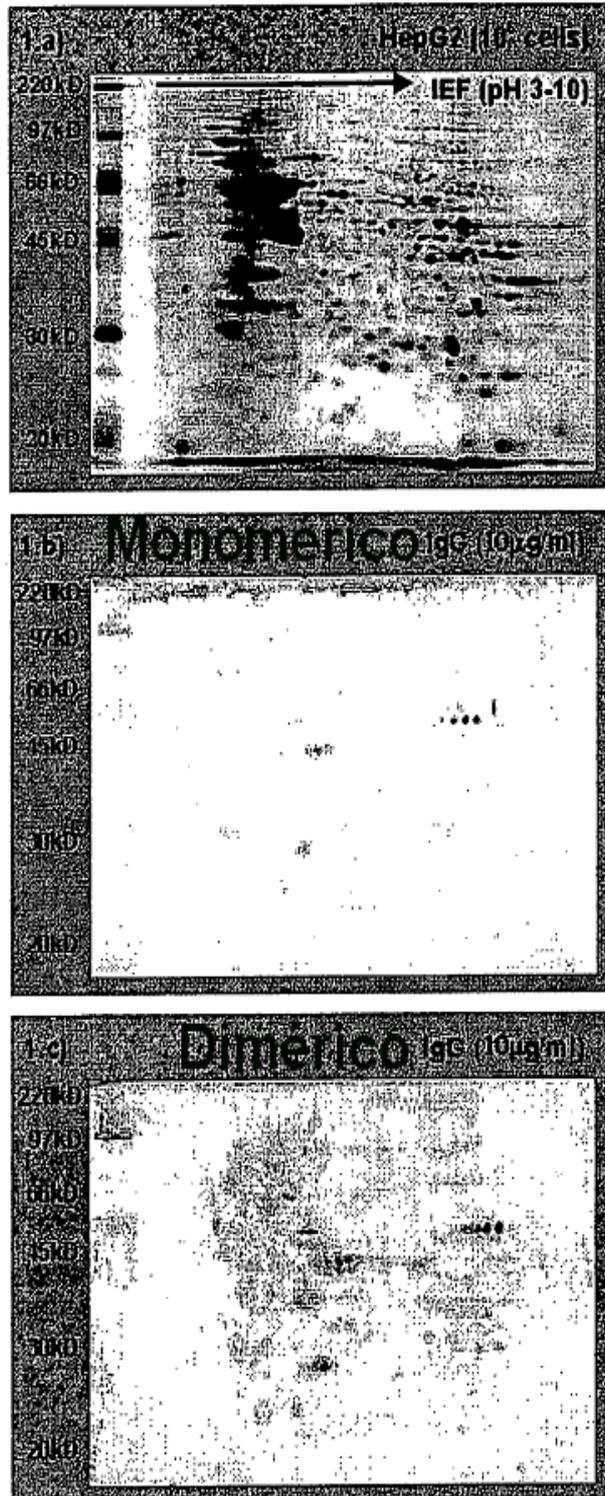


Figura 16

Perfiles FACS de células COS-7 (HEP-G2, HEp-2, CHO)

