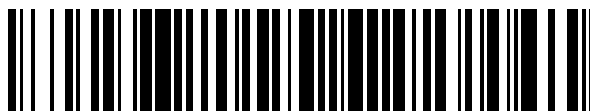


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 915**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.1999** **E 10011725 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014** **EP 2270044**

54 Título: **Producto de inmunoglobulina G (IgG) líquido**

30 Prioridad:

09.06.1998 EP 98201909
28.09.1998 US 102055 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2015

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 2 527 915 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

Producto de inmunoglobulina G (IgG) líquido

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para purificar inmunoglobulinas, es decir, inmunoglobulina G (IgG), a partir de plasma en bruto o a partir de una fracción de proteína plasmática en bruto. La presente invención también se refiere a un producto de inmunoglobulina y al uso de tal producto de inmunoglobulina para fines médicos.

10 Antecedentes de la invención

Las inmunoglobulinas humanas normales (IHN) para su uso en la prevención y tratamiento de varias enfermedades infecciosas se introdujeron al final de la década de 1940. Las IHN preparadas mediante el método de fraccionamiento con etanol en 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 posteriormente también mediante la modificación realizada por Kistler y Nitschmann (Kistler P y Nitschmann HS, (1952), Vox Sang, 7, 414-424) demostraron ser eficaces y seguras contra la transmisión de infección por virus cuando se administraban por vía subcutánea o por vía intramuscular.

La falta de inmunoglobulinas total o parcial congénita o adquirida (síndrome de inmunodeficiencia primaria y secundaria, respectivamente) se manifiesta por sí misma a través de infecciones habituales y graves frecuentes, especialmente de naturaleza bacteriana. La prevención de tales infecciones se logró previamente mediante inyecciones intramusculares o subcutáneas repetidas de grandes cantidades de IHN durante hasta varias veces a la semana como tratamiento de por vida, lo que es muy doloroso cuando el medicamento se administra por vía intramuscular.

Por tanto, al principio de la década de 1960 se intentó la administración de IHN por la vía intravenosa. Los ensayos mostraron que aproximadamente el 5% de los voluntarios sanos y aproximadamente el 95% de los pacientes con deficiencia de inmunoglobulinas desarrollaron efectos adversos inmediatos que variaban desde disnea hasta choque circulatorio y que eran de naturaleza tan grave que la administración intravenosa de IHN tuvo que abandonarse.

El motivo de los efectos adversos mencionados anteriormente resultó ser agregados de inmunoglobulinas que, entre otros efectos, activaban fuertemente el sistema del complemento. Esto se observó particularmente en pacientes que carecían de inmunoglobulinas. Pudieron observarse efectos adversos especialmente graves de naturaleza anafiláctica en pacientes que desarrollaron anticuerpos frente a IgA. En consecuencia, se desarrollaron métodos para evitar la formación de agregados y/o eliminar estos agregados durante el proceso de preparación, y hace unos veinte años se sometió a prueba la primera generación de una inmunoglobulina para administración intravenosa (IGIV) y se encontró que era adecuada.

El fin original de las IGIV era aliviar los episodios infecciosos en pacientes con falta de inmunoglobulinas total o parcial congénita o adquirida, y eliminar las molestias relacionados con la administración de IHN. Otra ventaja de las IGIV es que pueden administrarse dosis grandes de inmunoglobulina en un corto tiempo, y por esto es posible obtener concentraciones en sangre suficientemente altas de manera muy rápida. Especialmente cuando se tratan infecciones bacterianas graves, es de importancia establecer altas concentraciones en los sitios de infección rápidamente.

En los últimos años, se ha demostrado que las IGIV son eficaces en otras enfermedades graves cuyo tratamiento puede ser difícil de otra manera, por ejemplo hemorragias provocadas por la desaparición de las plaquetas sanguíneas con una base inmunológica, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), en algunas enfermedades raras tales como el síndrome de Kawasaki y varias enfermedades autoinmunitarias tales como polirradiculitis (síndrome de Guillain-Barre). Otras enfermedades cuyo tratamiento ha sido difícil hasta ahora están sometiéndose actualmente a ensayos clínicos con IGIV. El mecanismo de acción en estas enfermedades sólo se ha esclarecido parcialmente. El efecto se supone que está relacionado con las denominadas propiedades inmunomoduladoras de IgG, por ejemplo un bloqueo de receptores de Fcγ en células fagocíticas, un aumento del metabolismo de IgG, la regulación por disminución de la producción de citocinas y la interferencia con una supuesta red de idiotipos/antiidiotipos, especialmente relevante para la neutralización de la reactividad autoinmunitaria.

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

El material de partida para las IGIV eran IHN que se había demostrado que eran seguras con respecto a la transmisión de virus cuando se usaban para administración intramuscular. Por tanto, se consideró que las IGIV eran seguras. Sin embargo, tras varios años de uso clínico, se mostró sorprendentemente que los productos de IGIV de

algunos fabricantes provocaban la transferencia de la infección por virus de la hepatitis C.

Estudios para dilucidar el destino de los virus durante la producción de IHN mostraron que la eliminación de virus en el proceso de fraccionamiento del plasma para dar IHN es modesta. La seguridad de las IHN para uso intramuscular es probable que se deba al hecho de que contiene inmunoglobulinas protectoras. En combinación con el modesto volumen inyectado y la vía intramuscular de administración, estas inmunoglobulinas protectoras pueden neutralizar e inutilizar virus comunes en plasma no infeccioso. Especialmente cuando se administran por vía intravenosa grandes dosis de inmunoglobulinas, pueden producirse infecciones por virus tal como se demostró al principio de la década de 1990. Por tanto, se reconoció que los procesos de producción deben comprender una o más etapas bien definidas de inactivación y/o eliminación de virus.

Una segunda generación de IGIV basada en moléculas de inmunoglobulina no escindidas y no modificadas con baja actividad anticomplementaria y alta estabilidad se introdujo a mediados de la década de 1980, pero todavía en forma de un producto liofilizado. Estas IGIV se purificaban mediante varias etapas de cromatografía. Los productos de ese tipo dominan actualmente el mercado de IGIV. Las generaciones primera y segunda de IGIV, por tanto, aparecen como polvos liofilizados que se disuelven inmediatamente antes de su uso.

La disolución de IGIV liofilizada es lenta (hasta 30 minutos para un vial). A menudo tienen que disolverse varias porciones para un paciente. Puesto que es de alta prioridad para los usuarios tener una IGIV en disolución lista para su uso, se han introducido productos líquidos en el mercado. De manera más importante, todavía existe una necesidad de mejora de los procesos de producción con el fin de obtener una preparación de IGIV altamente purificada, estable y completamente nativa con eficacia clínica superior y menos reacciones farmacológicas adversas. Por tanto, se necesita un proceso mejorado y desarrollado adicional para purificar IgG a partir de plasma en bruto o una fracción de proteína plasmática para obtener un producto de IGIV líquido seguro con respecto a los virus. Finalmente, el proceso debe diseñarse de tal manera que pueda usarse en una producción a gran escala.

El proceso de purificación descrito en la presente solicitud conduce a un producto de inmunoglobulina líquido para administración intravenosa que puede caracterizarse como una nueva generación de IGIV altamente purificada, completamente nativa, biológicamente activa, doblemente inactivada con respecto a virus y estable, que no contiene ningún detergente, polietilenglicol (PEG) o albúmina como estabilizador.

El documento WO 86/06727 y el documento US 4.296.027 dan a conocer métodos alternativos para la preparación de inmunoglobulinas.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un producto de inmunoglobulina líquido mejorado que, entre otras cosas, puede administrarse por vía intravenosa.

Un producto de inmunoglobulina obtenido mediante el método dado a conocer en el presente documento podría denominarse IGIV de tercera generación. El proceso se caracteriza por las siguientes condiciones para el fraccionamiento: se evita la escisión con pepsina, se eliminan agregados y partículas por precipitación (una etapa de proceso validada para funcionar como etapa de eliminación de virus), se logra una purificación adicional mediante métodos de intercambio iónico de cromatografía en columna, se introduce un tratamiento con S/D como etapa de inactivación de virus y la preparación se formula como un producto líquido.

Debido a la pureza mejorada del producto de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante el proceso en comparación con los productos de la técnica anterior, no es necesaria la adición de estabilizadores tales como detergente no iónico, PEG o albúmina con el fin de evitar la agregación de la IgG durante el almacenamiento de la IGIV como producto líquido. El producto que puede obtenerse mediante el proceso tiene una calidad superior a la de los productos de la técnica anterior y proporciona efectos clínicos mejorados, y los efectos adversos, no deseados están prácticamente ausentes.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un producto de inmunoglobulina G (IgG) líquido derivado de plasma en bruto o de una fracción de proteína plasmática en bruto, que tiene las siguientes características:

a) una pureza de más del 95%,

b) un contenido de monómeros y dímeros de IgG de al menos el 95% y

c) un contenido de IgA de menos de 6 mg de IgA/l

en el que la concentración de IgG es del 1-20% en peso.

Preferiblemente, la pureza es de al menos el 97%, más preferiblemente la pureza es de al menos el 98%.

Preferiblemente, el contenido de monómeros y dímeros de IgG es de al menos el 97%, más preferiblemente, el contenido de monómeros y dímeros de IgG es de al menos el 98%.

5 Preferiblemente, el contenido de IgA en el producto de IgG es de menos de 4 mg de IgA/l. Más preferiblemente, el contenido de IgA es de menos de 3 mg de IgA/l, incluso más preferiblemente el contenido de IgA es de menos de 2 mg de IgA/l.

10 Preferiblemente, el producto de IgG de la presente invención no comprende albúmina como estabilizador. Más preferiblemente, el producto de IgG no comprende detergente no iónico, PEG o albúmina como estabilizador.

Preferiblemente, el pH del producto de IgG de la presente invención está en el intervalo de 5,1-5,7.

15 La concentración de IgG en el producto de IgG según la presente invención puede ser del 5% o el 10% en peso. Preferiblemente, la concentración de IgG es del 12%, el 14%, el 16%, el 18% o el 20% en peso.

Preferiblemente, el producto de IgG de la presente invención contiene menos del 1,5% de polímeros y agregados.

20 En una realización, la presente invención se refiere a un producto de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante un proceso para purificar inmunoglobulinas, es decir IgG, a partir de plasma en bruto o una fracción de proteína plasmática que contiene inmunoglobulina, proceso que comprende las etapas de:

25 (a) preparar una suspensión acuosa de la fracción de proteína plasmática que contiene inmunoglobulina en bruto;

(b) añadir un precipitante de proteínas soluble en agua, sustancialmente no desnaturizante a dicha suspensión de la etapa a) en una cantidad suficiente para provocar la precipitación de una alta proporción de las proteínas G distintas de inmunoglobulina, inmunoglobulinas agregadas y partículas incluyendo partículas potencialmente infecciosas tales como partículas virales, sin provocar la precipitación sustancial de inmunoglobulina G monomérica, formando de ese modo una mezcla de un precipitado sólido y un sobrenadante líquido;

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

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

(e) eliminar por lavado los contaminantes proteicos y los precipitantes de proteínas de la resina de intercambio catiónico de la etapa (d) con un tampón que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para eliminar los contaminantes de la resina sin provocar la elución sustancial de la inmunoglobulina G;

40 (f) eluir la inmunoglobulina G de la resina de intercambio catiónico con un tampón sustancialmente no desnaturizante que tiene un valor de pH y una fuerza iónica suficientes para provocar la elución eficaz de la inmunoglobulina G, recuperando de ese modo un eluato que contiene inmunoglobulina G;

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

50 (h) añadir una cantidad viricida de agente de inactivación de virus a la fracción dializada/ultrafiltrada y opcionalmente estabilizada que contiene inmunoglobulina G de la etapa (g) dando como resultado una disolución que contiene inmunoglobulina G sustancialmente segura con respecto a los virus;

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

55 (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 de inactivación de virus de la resina sin provocar la elución sustancial de la inmunoglobulina G;

60 (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 provocar la elución eficaz de la inmunoglobulina G, recuperando de ese modo un eluato que contiene inmunoglobulina G; y

(l) someter el eluato que contiene inmunoglobulina G de la etapa (k) a una dia/ultrafiltración para disminuir la fuerza iónica y concentrar la inmunoglobulina G de la disolución, y ajustar la osmolalidad añadiendo un sacárido.

65 El material de partida para el presente proceso de purificación puede ser plasma en bruto, pero es ventajosamente

una fracción de proteína plasmática en bruto que contiene inmunoglobulina. El material de partida para el proceso de purificación puede ser plasma humano normal o puede originarse de donantes con altos títulos de anticuerpos específicos, por ejemplo plasma hiperinmune. En la presente memoria descriptiva, el término "fracción plasmática que contiene inmunoglobulina" abarca todos los materiales de partida posibles para el presente proceso, por ejemplo plasma libre de crioprecipitado o plasma libre de crioprecipitado del que se han eliminado diversas proteínas plasmáticas, tales como factor IX y antitrombina, diferentes fracciones de Cohn y fracciones obtenidas a través de procedimientos de precipitación por PEG (Polson *et al.* (1964), *Biochem Biophys Acta*, 82, 463-475; Polson y Ruiz-Brazo, (1972)) Vos Sang, 23, 107-118) o por sulfato de amonio. Preferiblemente, la fracción de proteína plasmática son las fracciones II y III de Cohn, pero también pueden usarse la fracción II de Cohn o las fracciones I, II y III de Cohn. Las diferentes fracciones de Cohn se preparan preferiblemente a partir de plasma mediante un método de fraccionamiento de Cohn convencional, esencialmente tal como se modificó por Kistler-Nitschmann. Además de las inmunoglobulinas, las fracciones de Cohn contienen por ejemplo fibrinógeno, α -globulinas y β -globulinas, incluyendo diversas lipoproteínas, que deben eliminarse preferiblemente durante el proceso de purificación posterior. Puede estar presente o no un asistente de filtración dependiendo del método de aislamiento usado para obtener las fracciones de Cohn (es decir, centrifugación o filtración).

La primera etapa del proceso implica preparar una suspensión acuosa de una fracción de proteína plasmática que contiene inmunoglobulina, en el que la concentración de IgG en la suspensión es suficientemente alta para que, durante la siguiente etapa de precipitación, una proporción principal de las proteínas distintas de IgG, especialmente las de peso molecular superior, las inmunoglobulinas agregadas y otras proteínas agregadas así como partículas potencialmente infecciosas, precipiten sin precipitación sustancial de IgG monomérica. Esto se logra generalmente si la concentración de la IgG en la suspensión tamponada y filtrada es de al menos aproximadamente 4 g/l antes de la adición del precipitante. Debe tenerse en cuenta que la influencia de la concentración de proteína así como el pH y la temperatura de la suspensión sobre la etapa de precipitación depende del precipitante elegido.

Se prefiere que la fracción de proteína plasmática se suspenda en agua y/o tampón a una temperatura y un pH sustancialmente no desnaturalizantes. El término "sustancialmente no desnaturalizante" implica que las condiciones a las que hace referencia el término no provocan una pérdida sustancial irreversible de la actividad funcional de las moléculas de IgG, por ejemplo, pérdida de la actividad de unión a antígeno y/o pérdida de la función biológica de Fc (véase el ejemplo 2).

Ventajosamente, la fracción de proteína plasmática se suspende en agua acidificada con al menos un sistema de tampón no desnaturalizante a volúmenes de desde 6 hasta 9, preferiblemente desde 7 hasta 8 veces el de la fracción de proteína plasmática. El pH de la suspensión que contiene inmunoglobulina se mantiene preferiblemente a un pH por abajo de 6, tal como dentro del intervalo de 4,0-6,0, preferiblemente de 5,1-5,7, lo más preferiblemente de aproximadamente 5,4, con el fin de garantizar una solubilidad óptima de las inmunoglobulinas y para garantizar un efecto óptimo de la etapa de precipitación con PEG posterior. Puede utilizarse cualquier tampón ácido adecuado, pero el sistema de tampón contiene preferiblemente al menos uno de los siguientes tampones y ácidos: fosfato de sodio, acetato de sodio, ácido acético, HCl. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden usarse otros muchos tampones.

La suspensión de inmunoglobulina se mantiene preferiblemente a una temperatura fría, entre otros con el fin de evitar la desnaturalización de proteínas sustancial y para minimizar la actividad proteasa. La suspensión de inmunoglobulina y el agua, así como el sistema de tampón añadido, tienen preferiblemente la misma temperatura dentro del intervalo de 0-12°C, preferiblemente de 0-8°C, lo más preferiblemente de 1-4°C.

La suspensión de una pasta precipitada con etanol contiene cantidades relativamente grandes de material proteico agregado. Opcionalmente, la suspensión que contiene inmunoglobulina se filtra con el fin de eliminar, por ejemplo, agregados grandes, el asistente de filtración, si está presente, y la pasta residual no disuelta. La filtración se realiza preferiblemente por medio de filtros de profundidad, por ejemplo C150 AF, AF 2000 o AF 1000 (Schenk), 30LA (Cuno) o filtros similares. La eliminación de agregados, asistentes de filtración, si están presentes, y material proteico residual no disuelto también podría llevarse a cabo por centrifugación.

Se añade al menos un precipitante de proteínas soluble en agua, sustancialmente no desnaturalizante a la suspensión filtrada que contiene inmunoglobulina en una cantidad suficiente para provocar la precipitación de una alta proporción de proteínas de alto peso molecular, lipoproteínas, proteínas agregadas, entre éstas inmunoglobulinas agregadas. Otro material particulado, tal como partículas potencialmente infecciosas, por ejemplo partículas de virus, también precipitan sin provocar la precipitación sustancial de IgG monomérica. El término "partículas infecciosas" en el presente contexto comprende por ejemplo partículas de virus (tales como virus de la hepatitis, VIH1 y VIH2) y bacterias.

Los precipitantes de proteínas sustancialmente no desnaturalizantes, solubles en agua se conocen bien en el campo de la purificación de proteínas. Tales precipitantes se usan para el fraccionamiento de proteínas, dando como resultado la purificación parcial de las proteínas a partir de suspensiones. Los precipitantes de proteínas adecuados para su uso en el proceso de la presente invención incluyen diversas formas de peso molecular de PEG, ácido caprílico y sulfato de amonio. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden utilizarse varios otros precipitantes

solubles en agua no desnaturalizantes como medios alternativos para la precipitación. El término “añadir un precipitante de proteínas” y variantes de ese término implican la adición de uno o más tipos de agentes de precipitación de proteínas.

- 5 Un 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 usar PEG como precipitante es que el PEG es no iónico y tiene propiedades de estabilización de proteínas, por ejemplo, PEG en una baja concentración se conoce bien como estabilizador de productos de IGIV. La etapa de precipitación también funciona como etapa de eliminación de virus. El PEG concentra y precipita los virus independientemente de la especie, el tamaño y el recubrimiento de superficie de los mismos.

- 15 Se añade una cantidad dada de precipitante de proteínas a la suspensión filtrada para precipitar la mayoría de las partículas y proteínas agregadas y de alto peso molecular, sin una precipitación sustancial de IgG monomérica, formando una disolución de sobrenadante transparente. El precipitante de proteínas puede añadirse como un polvo sólido o una disolución concentrada.

- 20 Para PEG como precipitante, se aplica la regla general de que cuanto más alto sea el peso molecular del compuesto, más baja será la concentración de PEG necesaria para provocar que precipiten las proteínas. Cuando se utiliza PEG 3350, PEG 4000 o preferiblemente PEG 6000, la concentración del precipitante en la suspensión filtrada está ventajosamente dentro del intervalo del 3-15% en peso, tal como del 4-10% (tal como aproximadamente el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%), donde el 6% es lo más preferido. En la etapa de precipitación, se permite que el proceso de precipitación avance al menos hasta que se alcanza el equilibrio entre la fase sólida y la líquida, por ejemplo, habitualmente durante al menos 2 horas, tal como de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 12 horas, preferiblemente de manera aproximada 4 horas. Durante toda la precipitación la suspensión se mantiene preferiblemente a baja temperatura (por ejemplo menos de aproximadamente 12°C, tal como menos de aproximadamente 10°C, preferiblemente entre 2 y 8°C). La temperatura más adecuada depende de la identidad del precipitante de proteínas.

- 30 Tras la finalización de la precipitación de proteínas, se recupera un sobrenadante clarificado que contiene IgG casi exclusivamente en forma monomérica de la mezcla de precipitado sólido y sobrenadante líquido resultante de la precipitación. La recuperación puede realizarse mediante técnicas convencionales para separar líquido de una fase sólida, tal como centrifugación y/o filtración. Preferiblemente, se utiliza una centrífuga de flujo continuo (por ejemplo Westfalia) con una fuerza de 1000-5000 g.

- 35 Opcionalmente, el sobrenadante que contiene IgG recuperado, clarificado, se filtra en profundidad para eliminar partículas más grandes y agregados. A esto le sigue opcionalmente 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 por ejemplo bacterias de la disolución.

- 40 El 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 distintos de IgG restantes, por ejemplo IgA, albúmina así como agregados. Preferiblemente, el sobrenadante clarificado y opcionalmente filtrado que contiene IgG se aplica a una resina de intercambio aniónico y posteriormente a una resina de intercambio catiónico empaquetadas en dos columnas de dimensiones apropiadas.

- 50 Cuando se realizan las etapas de cromatografía de intercambio iónico para la purificación de IgG, se prefiere que las condiciones, por ejemplo el pH y la fuerza iónica, se elijan de tal manera que una porción principal de los contaminantes (por ejemplo proteínas distintas de IgG tales como IgA, transferrina, albúmina y agregados) en la disolución aplicada se unan a la resina de intercambio aniónico, mientras que sustancialmente ninguna IgG se adsorba a la resina de intercambio aniónico. Con respecto a la posterior cromatografía de intercambio catiónico, las condiciones preferidas elegidas dan como resultado la unión de sustancialmente todas las moléculas de IgG presentes en la disolución aplicada a la resina de intercambio catiónico. Los contaminantes proteicos no adsorbidos a la resina de intercambio aniónico y el agente de precipitación se eliminan en el posterior lavado de la resina de intercambio catiónico.

- 60 Preferiblemente, la resina de intercambio aniónico y la resina de intercambio catiónico están conectadas en serie. En el presente contexto, el término “conectado en serie”, cuando se usa 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 sobre la resina de intercambio catiónico sin cambio de tampón ni de otras condiciones.

- 65 Existen varios motivos que hacen ventajoso que la cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía de intercambio catiónico se llevan a cabo en una etapa usando dos columnas de cromatografía conectadas en serie, en vez de dos etapas de cromatografía independientes, por ejemplo con diferentes composiciones de tampón. El uso de dos columnas de cromatografía conectadas en serie hace que la operación sea más práctica, por ejemplo no hay

la necesidad de una etapa intermedia de recogida de la fracción que contiene IgG entre los dos métodos de cromatografía de intercambio iónico, para posiblemente ajustar el pH y la fuerza iónica. Además, el flujo de 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 de cromatografía 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 mencionó anteriormente, sería más laborioso en comparación con mantener las resinas de intercambio iónico conectadas en serie.

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

Tal como conocerá un experto en la técnica, los intercambiadores iónicos pueden basarse en diversos materiales con respecto a la matriz así como a los grupos cargados unidos. Por ejemplo, pueden usarse las siguientes matrices, en las que los materiales mencionados pueden estar más o menos reticulados: a base de agarosa (tal como Sepharose CL-6B®, Sepharose Fast Flow® y Sepharose High Performance®), a base de celulosa (tales como DEAE Sephacel®), a base de dextrano (tales como Sephadex®), a base de sílice y a base de polímeros sintéticos. Para la resina de intercambio aniónico, los grupos cargados que se unen covalentemente a la matriz, por ejemplo, pueden ser dimetilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y/o amonio cuaternario (Q). Para la resina de intercambio catiónico, los grupos cargados que se unen covalentemente a la matriz, por ejemplo, pueden ser carboximetilo (CM), sulfopropilo (SP) y/o metilsulfonato (S). En una realización preferida del presente proceso, la resina de intercambio aniónico empleada es DEAE Sepharose Fast Flow®, pero pueden usarse otros intercambiadores de aniones. Una resina de intercambio catiónico preferida es la CM Sepharose Fast Flow®, pero pueden usarse otros intercambiadores catiónicos.

El volumen apropiado de resina usada cuando se empaqueta en una columna de cromatografía 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 de, por ejemplo, la cantidad de IgG en la disolución aplicada y la capacidad de unión de la resina usada.

Antes de realizar una cromatografía de intercambio iónico, la resina de intercambio iónico se equilibra preferiblemente con un tampón que permite que la resina se una a sus contraiones. Preferiblemente, las resinas de intercambio aniónico y catiónico se equilibran con el mismo tampón, ya que esto facilita el proceso puesto que sólo tiene que prepararse y usarse un tampón.

Por ejemplo, si la resina de intercambio aniónico elegida es DEAE Sepharose FF® y la resina de intercambio catiónico es CM Sepharose FF® y las columnas están conectadas en serie, entonces las columnas se equilibran ventajosamente ambas con un tampón ácido no desnaturizante que tiene aproximadamente el mismo pH y fuerza iónica que la disolución de IgG que va a cargarse. Son adecuados cualquiera de una variedad de tampones para el equilibrado de las columnas de intercambio iónico, por ejemplo, acetato de sodio, fosfato de sodio, tris(hidroximetil)aminometano. Los expertos en la técnica apreciarán que pueden usarse muchos otros tampones para el equilibrado siempre que el pH y la conductividad sean aproximadamente los mismos que para la disolución de IgG aplicada. Un tampón preferido para el equilibrado de la columna de intercambio aniónico y la columna de intercambio catiónico cuando están conectadas en serie es un tampón acetato de sodio que tiene una concentración de acetato de sodio dentro del intervalo de 5-25 mM, tal como dentro del intervalo de 10-20 mM, preferiblemente de aproximadamente 15 mM. Se prefiere que el pH del tampón acetato de sodio usado para el equilibrado esté dentro del intervalo de 5,0-6,0, tal como dentro del intervalo de 5,4-5,9, preferiblemente de aproximadamente 5,7. La conductividad está dentro del intervalo de 1,0-1,4 mS/cm, preferiblemente de aproximadamente 1,2 mS/cm. Pueden prepararse tampones acetato adecuados a partir de acetato de sodio trihidratado y ácido acético glacial.

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

Después de cargar el sobrenadante que contiene IgG en las columnas en serie, las columnas se lavan preferiblemente (lavado inicial) con un volumen de columna de un tampón de lavado con el fin de garantizar que la disolución que contiene IgG se transfiera cuantitativamente de la columna de intercambio aniónico a la columna de intercambio catiónico. Posteriormente, las columnas de intercambio aniónico e intercambio catiónico se desconectan y la columna de intercambio catiónico se lava preferiblemente con el fin de eliminar contaminantes proteicos de la resina 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 provocar la elución sustancial de IgG.

El lavado inicial se realiza ventajosamente usando el tampón de equilibrado, aun cuando puedan utilizarse otros tampones con un valor de concentración y pH similar para el lavado. Se prefiere que se use un tampón acetato para eliminar por lavado los contaminantes de la resina de intercambio catiónico. El pH del tampón podría ser de desde 5,0 hasta 6,0, tal como dentro del intervalo de 5,2-5,8, por ejemplo de aproximadamente 5,4.

La elución de la IgG de la resina de intercambio catiónico se realiza preferiblemente con un tampón sustancialmente no desnaturante que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para provocar la elución eficaz de la IgG, recuperando de ese modo un eluato que contiene IgG. En este contexto, elución eficaz significa que al menos el 75%, tal como el 80%, por ejemplo al menos el 85% de las proteínas IgG cargadas sobre las resinas de intercambio aniónico y catiónico en serie se eluyen de la resina de intercambio catiónico. La elución se lleva a cabo ventajosamente como una etapa de elución en gradiente. El tampón preferido usado es acetato de sodio que tiene un pH dentro del intervalo de 5,0-6,0, por ejemplo de 5,2-5,8, preferiblemente de aproximadamente 5,4 y una concentración dentro del intervalo de 5-40 mM, por ejemplo dentro del intervalo de 10-25 mM, preferiblemente de aproximadamente 15 mM.

Se prefiere que la concentración de sal del tampón de elución sea suficientemente alta como para desplazar la IgG de la resina. Sin embargo, se contempla que puede usarse un aumento de pH y una concentración de sal inferior para eluir la IgG de la resina. Preferiblemente, la elución se realiza como una elución en gradiente de sal continua con concentraciones de cloruro de sodio dentro del intervalo de 5-500 mM, preferiblemente de desde aproximadamente 125 hasta 350 mM de cloruro de sodio.

La elución también puede realizarse mediante elución en gradiente escalonado. Se contempla que la elución también pueda realizarse como una elución en sal constante, en la que el tampón de elución aplicado a la columna de intercambio catiónico tiene sólo una única concentración de sal en contraposición a la elución en gradiente. Si se realiza una elución en sal constante, la concentración de sal puede estar ventajosamente dentro del intervalo de aproximadamente 350 a aproximadamente 500 mM de cloruro de sodio. La ventaja de la elución en gradiente en comparación con la elución de sal constante es que la elución es más eficaz con un gradiente de sal, pero otra ventaja es que el eluato tiene una fuerza iónica inferior, lo que es ventajoso debido a que una alta fuerza iónica es crítica para la estabilidad de la IgG. El tampón de elución puede comprender además un agente de estabilización de proteínas tal como los que se mencionarán a continuación. Pueden utilizarse otros diversos sistemas de tampón adecuados para eluir la IgG, tal como apreciarán los expertos en la técnica.

Preferiblemente, se aplica al menos un agente de estabilización de proteínas a la fracción de IgG inmediatamente después o durante la elución. Los agentes de estabilización de proteínas los conocen los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diferentes alcoholes de azúcares 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 estabilizador intermedio seleccionado puede ser uno que pueda eliminarse de la disolución que contiene IgG en las etapas posteriores.

La concentración adecuada del agente de estabilización de proteínas en la disolución que contiene IgG depende del agente específico empleado. El agente estabilizador puede ser sorbitol, preferiblemente a una concentración final dentro del intervalo del 2-15% (p/v) de sorbitol, por ejemplo aproximadamente del 2,5%.

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

Las membranas empleadas para la dia/ultrafiltración ventajosamente tienen un corte de peso nominal dentro del intervalo de 10.000 a 100.000 Da. Un tipo de membrana preferido para el presente proceso es una membrana de polisulfona con un corte de peso nominal de 30.000 Da, obtenida de Millipore. Pueden emplearse otras membranas de ultrafiltración de material y porosidad comparables.

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

Después de la dia/ultrafiltración, la concentración del agente de estabilización de proteínas se ajusta ventajosamente en la disolución, si es necesario, a la concentración final óptima característica para el agente de estabilización de proteínas específico que se empleó. Si se usa sorbitol, la concentración de sorbitol se ajusta preferiblemente a

aproximadamente el 10% en peso.

Se prefiere que la disolución estabilizada se filtre con un filtro con un diámetro de poro dentro del intervalo de 0,2-1,0 μm , preferiblemente de aproximadamente 0,45 μm , con el fin de eliminar los agregados antes de la siguiente etapa. En esta fase, la disolución que contiene IgG tiene un aspecto de disolución transparente de un volumen apropiado con una alta estabilidad como el resultado combinado de la alta pureza, la baja fuerza iónica, el pH ácido, la concentración relativamente alta de IgG y el estabilizador añadido.

En el proceso de producción del producto de IGIV, se incorporan actualmente al menos dos etapas definidas y validadas de eliminación e inactivación de virus, siendo preferiblemente estas etapas precipitación con PEG como etapa de eliminación de virus general y un tratamiento con S/D como etapa de inactivación de virus contra virus con envuelta lipídica. Además, los estrictos requisitos de seguridad con respecto a virus de los materiales de partida, según las normas internacionales, y la capacidad de reducción de virus bien conocida de un proceso de purificación de múltiples etapas, la incorporación de dos etapas de reducción de virus independientes que son activas contra virus tanto con envuelta como sin envuelta, el medicamento de la presente invención es sustancialmente seguro con respecto a virus.

Los virus infecciosos con envuelta lipídica que todavía pudieran estar presentes en la disolución que contiene IgG se inactivan preferiblemente en esta fase del proceso mediante la adición de una cantidad viricida de un agente de inactivación de virus a la disolución que contiene IgG. El término una "cantidad viricida" de agente de inactivación de virus pretende indicar una cantidad que da lugar a una disolución en la que las partículas de virus se vuelven sustancialmente no infecciosas y mediante esto una "disolución que contiene IgG segura con respecto a virus" tal como se define en la técnica. Tal "cantidad viricida" dependerá del agente de inactivación de virus empleado así como de las condiciones tales como el tiempo de incubación, el pH, la temperatura, el contenido de lípidos y la concentración de proteína.

El término "agente de inactivación de virus" pretende indicar un agente o un método que puede usarse con el fin de inactivar virus con envuelta lipídica así como virus sin envuelta lipídica. El término "agente de inactivación de virus" debe entenderse que abarca tanto una combinación de tales agentes y/o métodos, siempre y cuando sea apropiada, así como un único tipo de tales agentes o métodos.

Los agentes de inactivación de virus preferidos son detergentes y/o disolventes, lo más preferiblemente mezclas de detergente/disolvente. Debe entenderse que el agente de inactivación de virus es opcionalmente una mezcla de uno o más detergentes con uno o más disolventes. El tratamiento con disolvente/detergente (S/D) es una etapa ampliamente usada para inactivar virus con envuelta lipídica (por ejemplo VIH1 y VIH2, hepatitis tipo C y no A-B-C, VLTH1 y 2, la familia de virus del herpes, incluyendo CMV y virus de Epstein-Barr) en productos sanguíneos. Puede usarse una amplia variedad de detergentes y disolventes para la inactivación de virus. El detergente puede seleccionarse del grupo que consiste de detergentes iónicos y no iónicos y se selecciona para que sea sustancialmente no desnaturizante. Preferiblemente se usa un detergente no iónico, ya que facilita la posterior eliminación del detergente de la preparación de IgG mediante la etapa posterior. Los detergentes adecuados se describen, por ejemplo, por Shanbrom *et al* en la patente estadounidense US 4.314.997 y la patente estadounidense US 4.315.919. Detergentes preferidos son los comercializados con las marcas comerciales Triton X-100 y Tween 80. Los disolventes preferidos para su uso en los agentes de inactivación de virus son di o trialkilfosfatos como los descritos por ejemplo por Neurath y Horowitz en patente estadounidense US 4.764.369. Un disolvente preferido es el tri(n-butil)fosfato (TNBP). Un agente de inactivación de virus especialmente preferido para la práctica de la presente invención es una mezcla de TNBP y Tween 80, pero alternativamente pueden usarse otras combinaciones. La mezcla preferida se añade en un volumen tal que la concentración de TNBP en la disolución que contiene IgG esté dentro del intervalo del 0,2-0,6% en peso, preferiblemente a una concentración de aproximadamente el 0,3% en peso. La concentración de Tween 80 en la disolución que contiene IgG está dentro del intervalo del 0,8-1,5% en peso, preferiblemente a una concentración de aproximadamente el 1% en peso.

La etapa de inactivación de virus se realiza en condiciones que inactivan virus con envuelta, dando como resultado una disolución que contiene IgG sustancialmente segura con respecto a virus. En general, tales condiciones incluyen una temperatura de 4-30°C, tal como 19-28°C, 23-27°C, preferiblemente de manera aproximada 25°C y un tiempo de incubación que se encuentra que es eficaz mediante estudios de validación. Generalmente es suficiente un tiempo de incubación de 1-24 horas, preferiblemente 4-12 horas, tal como aproximadamente 6 horas, para garantizar una inactivación de virus suficiente. Sin embargo, las condiciones apropiadas (temperatura y tiempos de incubación) dependen del agente de inactivación de virus empleado, del pH y de la concentración de proteína y el contenido de lípidos de la disolución.

Se contempla que también puedan emplearse otros métodos para la eliminación de o la inactivación de virus para producir un producto seguro con respecto a los virus, tal como la adición de azul de metileno con la posterior inactivación por radiación con luz ultravioleta o nanofiltración.

Después del tratamiento con el disolvente/detergente, la disolución se diluye ventajosamente con tampón. Opcionalmente, la disolución que contiene IgG sustancialmente segura con respecto a los virus se filtra,

preferiblemente a través de un filtro de profundidad tal como se describió anteriormente en una etapa anterior del presente proceso y/o a través de un filtro estéril.

Después de la inactivación del virus y preferiblemente una filtración, se realiza la cromatografía de intercambio iónico con el fin de eliminar el agente de inactivación de virus y los contaminantes proteicos. Esta etapa se realiza preferiblemente de la manera ya descrita para la etapa de cromatografía de intercambio iónico anterior en el presente proceso, con las excepciones de que el volumen de la resina de intercambio aniónico es aproximadamente la mitad que el de la resina de intercambio catiónico y que el lavado antes de la elución de la IgG es más extenso, utilizándose al menos seis volúmenes de columna de tampón. Adicionalmente, el tampón de equilibrado es acetato de sodio con una concentración dentro del intervalo de aproximadamente 5-25 mM, preferiblemente 15 mM y un pH dentro del intervalo de aproximadamente 5,0-5,8, preferiblemente 5,4. Tal como se mencionó previamente, el contenido de acetato de sodio y el pH de la disolución que contiene IgG se ajustan preferiblemente a la misma concentración y pH que el tampón de equilibrado. Adicionalmente, puede añadirse un agente de estabilización de proteínas, preferiblemente maltosa, al eluato recuperado hasta una concentración final dentro del intervalo del 1-5%, preferiblemente de aproximadamente el 2,5% en peso.

El método preferido de eliminación del agente de inactivación de virus es por cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, también se contempla que son útiles otros métodos tales como extracción con aceite y métodos cromatográficos alternativos. El método apropiado dependerá del agente de inactivación de virus empleado. La eliminación del disolvente/detergente puede lograrse por tanto uniendo la IgG a una resina y, posteriormente, eliminando por lavado meticulosamente el agente de inactivación con tampón. La cromatografía de intercambio catiónico es un método que puede usarse. En una realización preferida de la presente invención, también se realiza cromatografía de intercambio aniónico además de cromatografía de intercambio catiónico con el fin de mejorar la calidad y la pureza global del producto final del presente proceso.

Después de la etapa de cromatografía de intercambio iónico, el eluato que contiene IgG se dializa y se concentra preferiblemente; de esta manera el contenido de componentes proteicos más pequeños restantes también se reduce eficazmente. Ventajosamente, esto puede realizarse mediante dia/ultrafiltración tal como se describió anteriormente. El tampón empleado para la diafiltración es acetato de sodio, preferiblemente a una concentración de desde aproximadamente 4 hasta 10 mM, preferiblemente de 7,5 mM y a un pH dentro del intervalo de aproximadamente 4,0 a 6,0, preferiblemente de aproximadamente 5,1-5,7, tal como aproximadamente 5,4. Alternativamente, pueden usarse otros tampones tales como fosfato de sodio o ácidos para la diafiltración. La diafiltración continúa hasta que la conductividad sea menor o igual a 1 mS/cm. Opcionalmente, la disolución que contiene IgG se esteriliza por filtración adicionalmente.

Si se desea, la disolución que contiene IgG purificada que está sustancialmente libre del agente de inactivación de virus se somete a tratamientos adicionales con el fin de hacerla adecuada para su formulación como producto líquido para usarse por ejemplo por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía intramuscular.

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

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

Aunque no se prefiere, es evidente que los productos que pueden obtenerse mediante las diversas etapas del proceso descritas anteriormente también pueden usarse, por ejemplo, como productos liofilizados en vez de formulaciones líquidas, aunque esto es menos favorable en comparación con el uso de los productos de inmunoglobulina como formulaciones líquidas instantáneas. Esta última realización se describirá en mayor detalle a continuación.

Los productos de inmunoglobulina líquidos son lo más estables a una fuerza iónica notablemente inferior a la del plasma, es decir la conductividad es preferiblemente menor de 1,0 mS/cm, preferiblemente de aproximadamente 0,8 mS/cm.

El pH tiene un impacto sobre la estabilidad de la IgG y sobre la velocidad de infusión. Los productos de inmunoglobulina líquidos son lo más estables en condiciones ácidas, es decir por abajo del punto isoeléctrico de la IgG, pH 6,4-8,5. Cuanto más cercano esté el valor de pH al valor de pH fisiológico (7,1-7,3), mayor velocidad de infusión podrá emplearse. Como consecuencia de la estabilidad requerida, el pH del producto de inmunoglobulina de

la presente invención estará preferiblemente dentro del intervalo de 5,1-5,7, tal como entre 5,2 y 5,6, preferiblemente de aproximadamente 5,4.

Además, el producto de inmunoglobulina puede comprender agentes de estabilización de proteínas tal como se describió anteriormente. Además de alcoholes de azúcar y sacáridos (tales como sorbitol, manosa, glucosa, trehalosa, maltosa), también pueden usarse proteínas (tales como albúmina), aminoácidos (tales como lisina, glicina) y agentes orgánicos (tales como PEG y Tween 80) como estabilizadores. La concentración adecuada del agente estabilizante en la disolución que contiene IgG depende del agente específico empleado tal como se describió anteriormente.

La disolución de IgG purificada se ajusta, si es necesario, con el fin de obtener una disolución estable e isotónica. El término "disolución isotónica" pretende indicar que la disolución tiene la misma presión osmótica que el plasma. Tal como se mencionó anteriormente, la fuerza iónica es notablemente más baja en el producto de inmunoglobulina de la presente invención como formulación líquida que en el plasma. Por este motivo se prefieren usar monosacáridos o disacáridos para aumentar la osmolalidad de la disolución, puesto que esto no afecta a la fuerza iónica. Puede añadirse maltosa a una concentración que garantiza que la disolución sea isotónica y, al mismo tiempo, la maltosa funciona como agente de estabilización de inmunoglobulinas. Esto se realiza preferiblemente añadiendo la maltosa hasta una concentración final dentro del intervalo de aproximadamente el 5 al 15% (p/v), preferiblemente el 10% (p/v); alternatively pueden usarse otros sacáridos tales como manosa y glucosa.

Las condiciones finales preferidas para el producto de inmunoglobulina son un compromiso entre estabilidad y condiciones fisiológicamente aceptables con respecto a, por ejemplo, el pH, la fuerza iónica y la tonicidad. Además, el producto de inmunoglobulina debe cumplir con los requisitos de pruebas de control de calidad, tal como se especifican en la Monografía n.º 918, Ph. Eur. 1997.

Las principales ventajas del producto que puede obtenerse mediante el método de la presente invención son que, cuando se formula como una preparación líquida, el producto es una combinación de un líquido, un producto listo para usar que, al mismo tiempo, es muy estable, está altamente purificado, tiene una distribución de subclases de IgG en gran medida normal y tiene un contenido de IgA extremadamente bajo, así como un bajo contenido de IgM, y conserva la actividad de anticuerpo y la actividad biológica mostrada 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 alto de monómeros y dímeros de IgG. La IgG monomérica constituye al menos el 90%, lo que se considera que es ideal. Debido a la alta estabilidad, es posible evitar la adición de otros agentes estabilizadores, tales como albúmina, glicina, detergente o PEG. Finalmente, el producto es seguro con respecto a los virus, ya que el proceso comprende etapas bien definidas y validadas de reducción de virus dirigidas a eliminar y/o inactivar tanto virus con envuelta lipídica como virus sin envuelta lipídica.

El propósito de validar una etapa de producción como etapa de reducción de virus es proporcionar pruebas de que el proceso de producción inactivará/eliminará eficazmente los virus que se sabe que contaminan los materiales de partida o que podría concebirse que lo hacen. Los estudios de validación incluyen la adición deliberada de un virus antes de las etapas de producción que van a validarse 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 tanto, la validación debe realizarse en un laboratorio separado equipado para trabajo virológico en una versión a escala disminuida de la etapa de producción y debe realizarse por personal con experiencia virológica conjuntamente con los ingenieros de producción. La cantidad de virus añadida a los materiales de partida para la etapa de producción que va a validarse debe ser tan alta como sea posible con el fin de determinar la capacidad de la etapa de producción para inactivar/eliminar virus adecuadamente. Sin embargo, pueden hacerse adiciones conocidas del virus de tal manera que la composición del material de producción no se altere significativamente. Preferiblemente, el volumen, de la adición conocida de virus será igual o menor del 10%.

Deben realizarse ensayos de infectividad cuantitativos según los principios de GLP y pueden implicar la formación de placas, la detección de otros efectos citopáticos tales como la formación de sincitios o focos y titulación de punto final (por ejemplo, ensayos de TCID₅₀), la detección de la síntesis de antígenos virales u otros métodos. El método debe tener una sensibilidad y reproducibilidad adecuadas y debe realizarse con suficientes réplicas y controles para garantizar una exactitud estadística adecuada de los resultados.

Normalmente, se expone una etapa de proceso a 6 logaritmos de virus y si se logra una reducción del orden de 4 logaritmos o más, esto es indicativo de un claro efecto con el virus de prueba particular en investigación. De manera similar, una reducción del orden de 4,5 logaritmos, 5 logaritmos o incluso 5,5 logaritmos es indicativa de un claro efecto con el virus de prueba particular en investigación y la etapa puede clasificarse como una etapa de reducción de virus validada.

Los estudios de validación de virus deben realizarse con virus que se asemejen a los que puedan contaminar el

producto tanto como sea posible y, en segundo lugar, que representen un intervalo tan amplio de propiedades fisicoquímicas como sea posible, con el fin de someter a prueba la capacidad del sistema para eliminar virus en general.

- 5 Los estudios de validación de virus deben realizarse según la CPMP Note for Guidance on Virus Validation Studies: The Design, Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses (CPMP/BWP/268/95) y Note for Guidance on Plasma Derived Medicinal Products (CPMP/BWP/269/95).

Los estudios de validación del presente proceso se presentan en el ejemplo 5.

- 10 El producto de la presente invención tiene una pureza mayor del 95%, preferiblemente mayor del 98%. El grado de pureza entre otros, se debe al hecho de que el producto de la invención puede obtenerse mediante al menos una, preferiblemente dos, etapas de cromatografía de intercambio aniónico-catiónico opcionalmente conectadas en serie. Vale la pena indicar en este contexto que ha sido posible obtener un alto rendimiento a pesar del número de etapas de procesamiento empleadas, en escala de producción de al menos 3,5 g de proteína de IgG por kg de plasma congelado fresco.

- 20 Los estudios comparativos que se han llevado a cabo (ejemplo 2) han mostrado que el producto de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante el proceso descrito en el presente documento tiene propiedades funcionales ideales, tales como actividades de unión de antígeno prominentes y una alta función de Fc. El medicamento actualmente preferido desarrollado por los presentes inventores es una disolución de inmunoglobulina al 5% en peso. Las pruebas de estabilidad hasta la fecha han indicado una estabilidad en almacenamiento a 4°C durante más de un año, es decir, que el producto de inmunoglobulina está desprovisto de formación de agregados o fragmentación de inmunoglobulinas G, pérdida de la actividad biológica deseada o aumento de actividades no deseadas, por ejemplo actividad anticomplementaria y actividad prekaliceína, tal como se midió *in vitro*.

- 25 El producto de IgG de la presente invención tiene una pureza mayor del 95%, tal como de al menos el 96% o al menos el 97%, por ejemplo al menos el 98%, preferiblemente al menos el 99%, más preferiblemente al menos el 99,5%. El producto de IgG debe contener menos de 6 mg de IgA/I, tal como menos de 4 mg de IgA/I, preferiblemente menos de 3 mg de IgA/I, más preferiblemente menos de 2 mg de IgA/I.

- 30 Debe enfatizarse que otros productos contienen estabilizadores en forma de detergente, PEG o albúmina. En una realización preferida, el producto de la presente invención no contiene ninguno de dichos estabilizadores, en su lugar se ha elegido un sacárido bien tolerado.

- 35 El producto según la presente invención tiene como una de sus características un contenido muy bajo de polímeros y agregados. En una realización preferida, el producto de la presente invención contiene menos del 1,5% de polímeros y agregados, tal como menos del 1%, por ejemplo menos del 0,5% o menos del 0,25% de polímeros y agregados. El contenido de monómeros y dímeros de IgG es de al menos el 95%, tal como al menos el 96% o al menos el 97%, por ejemplo al menos el 98%, preferiblemente al menos el 98,5% o el 99%. El contenido de IgG monomérica es de al menos el 90% en el producto.

- 40 Algunos ensayos han mostrado el efecto clínico del producto según la presente invención en comparación con productos de IGIV registrados. El producto se ha tolerado bien por los pacientes y el tiempo de recambio de las inmunoglobulinas en la circulación se ha determinado que es de cuatro semanas. En los presentes ensayos, el efecto inmunomodulador de IGIV, SSI ha demostrado ser convincente (los datos se presentan en el ejemplo 3).

- 45 Las indicaciones para IGIV son hipo/agammaglobulinemia incluyendo inmunodeficiencia variable común, síndrome de Wiskott-Aldrich e inmunodeficiencia combinada grave (SCID), hipo/agammaglobulinemia secundaria en pacientes con leucemia linfática crónica (LLC) y mieloma múltiple, niños con SIDA e infecciones bacterianas, púrpura trombocitopénica idiopática crónica (PTI) aguda y crónica, trasplante de médula ósea (TMO) alogénico, 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.

- 50 Ginecología: aborto habitual, síndrome antifosfolípidos primario.

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

- 60 Hematología: neutropenia autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, neutropenia.

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

- 65 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 de IGIV, varias enfermedades autoinmunitarias graves que comúnmente responden a la terapia con corticosteroides e inmunosupresores, se consideran estados diana para la terapia con el producto de la presente invención. Entre éstas hay varias enfermedades neurológicas tales como polirradiculitis y algunas polineuropatías periféricas mediadas por el sistema inmunitario, pero también algunos estados vasculares y reumáticos inflamatorios crónicos tales como vasculitis sistémica que implica a vasos pequeños, polimiositis y otros.

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

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos.

Ejemplos

EJEMPLO 1

ETAPAS DE PROCESO EN LA PURIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINA (con la excepción de la etapa 5, todas las etapas se llevan a cabo a $5 \pm 3^\circ\text{C}$)

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

La pasta de 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 se modificó 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 se haya eliminado y, si se desea, tras la adsorción de determinadas proteínas plasmáticas (tales como factor IX y antitrombina) a por ejemplo un material de intercambio iónico y/o una matriz de Heparin Sepharose®.

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

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

A partir de 140 kg de pasta de fracción II + III incluyendo 30 kg de asistente de filtración (Schenk, Alemania) (correspondiente a un volumen de partida de plasma de aproximadamente 1150 kg), se logra la extracción añadiendo en primer lugar 525 kg de tampón fosfato de sodio/acetato 2,33 mM, pH 4,0, con agitación lenta durante aproximadamente 1,5 horas, seguido por dos adiciones consecutivas de 350 kg de agua para inyección (WFI) con agitación durante aproximadamente 1,5 horas después de cada adición. Finalmente, se añaden aproximadamente 280 kg de fosfato de sodio/acetato 21,5 mM, pH 7,0, ajustando de ese modo el pH de la suspensión a 5,4.

Se filtra la suspensión a través de un filtro de profundidad (C-150AF, Schenk, Alemania). El 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 filtrado de la etapa 2 hasta una concentración final del 6% en peso. Después de una precipitación durante 4 horas, se centrifuga la suspensión de PEG hasta la claridad en una centrifuga de flujo continuo (Westfalia BKA28, Alemania) y se filtra en profundidad (50LA y 90LA, Cuno, Francia) y posteriormente se esteriliza por filtración a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ (Durapore, Millipore, EUA). El sobrenadante de PEG filtrado se ajusta con tampón añadiendo 1 parte de tampón acetato de sodio 0,45 M, pH 5,7, a 29 partes del sobrenadante, para alcanzar un pH de 5,7.

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

Se empaquetan dos columnas de cromatografía 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 para que el flujo de líquido pase en primer lugar a través de la resina de DAE Sepharose y, posteriormente a través de la resina de CM Sepharose. Las resinas de las columnas se equilibran con tampón acetato de sodio 15 mM, pH 5,7. Después, se aplica la disolución de la etapa 3 a las dos columnas en serie.

Durante la cromatografía de intercambio iónico, la mayoría de las proteínas contaminantes en la disolución aplicada se unen a la resina de DEAE Sepharose. Mientras que 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 disolución migra a través de la misma. Después

de la aplicación de la disolución y el lavado con un volumen de columna de tampón de equilibrado, la columna de DEAE se desconecta de la columna de CM. Después, se lava la columna de CM con tres volúmenes de columna de tampón acetato de sodio 15 mM, pH 5,4, después se eluye la IgG con un gradiente de NaCl de desde 125 hasta 350 mM de NaCl, acetato de sodio 15 mM, pH 5,4. La fracción de IgG eluida se recoge en sorbitol hasta una concentración final del 2,5% en peso.

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

La fracción IgG eluida se concentra y se desaliniza por ultra/diafiltración hasta una concentración de aproximadamente 50 g de IgG/litro. La membrana empleada es una membrana de polisulfona, de corte de peso nominal de 30 kDa (Millipore). La diafiltración se realiza frente a un tampón acetato de sodio 15 mM, pH 5,4, que contiene el 2,5% en peso de sorbitol y se continúa hasta que la conductividad sea menor de 1,4 mS/cm. Se determina el contenido de IgG de la disolución espectrofotométricamente midiendo a 280 nm (A_{280}). La concentración del sorbitol se ajusta al 10% en peso y se filtra la disolución a través de un filtro de 0,45 μ m (Pall Corporation, GB). Después se añaden Tween 80 y TNBP hasta una concentración final del 1 y el 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.

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

Se equilibran las dos columnas conectadas en serie empaquetadas con 28 l de DEAE y 56 l de CM Sepharose FF®, respectivamente, con acetato de sodio 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 posterior elución de la IgG de la columna de CM se llevan a cabo esencialmente tal como se describió en la etapa 4, excepto porque la columna de CM se lava extensamente con 6 volúmenes de columna de tampón para eliminar los agentes del tratamiento con S/D. La fracción de IgG eluida se recoge en maltosa (Merck, Alemania) hasta una concentración final del 2,5% en peso.

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

La fracción de IgG eluida de la etapa 6 se somete a una ultrafiltración y desalinización por diafiltración frente a acetato de sodio 7,5 mM que contiene el 2,5% en peso de maltosa, pH 5,4 hasta una conductividad final de menos de 1 mS/cm. La membrana empleada es una membrana de polisulfona con un corte de peso nominal de 100 kDa que permite que las proteínas con peso molecular inferior se eliminen. La concentración final de IgG se ajusta a 50 g/litro y la maltosa se ajusta a una concentración final del 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 MEDIANTE EL PRESENTE PROCESO, EN COMPARACIÓN CON OTROS PRODUCTOS DE IGIV

	Gammonativ	Octagam	Gammagard	IVIG, SSI
	lío-filizado	líquido	lío-filizado	líquido
Pureza Albúmina	45,4% ¹ 50 mg/ml ²	99,1% pequeñas cantidades	94,6% ¹ 3 mg/ml ²	99,8% no detectable
Contenido de monómeros+dímeros	98,3% ³	96,8%	97,6% ³	99,3%
1: sin corrección para biltzerHSA; 2: declarado por el productor; 3: corregido para el pico de HSA;				
polímeros+agreg. ACA PKA	0,8% ³ 26% <8,5 El/ml	1,6% 30% <8,5 El/ml	<0,1% ³ 34% <8,5/ El/ml	<0,1% 32% <8,5 El/ml
Hemaglutinina, disolución al 3%				
anti-A > 1:2 anti-B > 1:2 función de Fc	negativo negativo 169%	negativo negativo 121%	negativo negativo 132%	negativo negativo 178%
Distribución de 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 ⁴	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 de proteínas)

- 5 Los requisitos de pureza de la Farmacopea para una preparación de IGIV son de al menos el 95% de IgG; es decir, no más del 5% de proteínas contaminantes distintas de IgG presentes. La pureza se considera de muy alta importancia por varios motivos. Desde un punto de vista racional, sólo la proteína que porta la función deseada debe estar presente y otras proteínas contaminantes pueden ser potencialmente peligrosas, por ejemplo, provocan efectos adversos no deseados y/o influyen en la estabilidad del producto.
- 10 La pureza puede analizarse, por ejemplo, mediante una técnica electroforética tal como se describe en detalle en Ph. Eur., 1997, páginas 964-965, en donde las proteínas se separan en un gel de acetato de celulosa. Sin embargo, por fines prácticos, se usa un gel de agarosa. Después de la electroforesis, el gel se fija, se seca y se tiñe. Finalmente, las bandas de proteína se monitorizan mediante barrido. A partir de la tabla anterior parece que el producto de la presente invención es prácticamente puro (99,8%).

Albúmina

- 20 Se analizó el contenido de albúmina mediante inmunolectroforesis cruzada, esencialmente tal como se describe por C.B. Laurell (anal Biochem (1965), 1,0, 358-361). Se analizaron 5 µl de producto contra anticuerpos anti-albúmina humana (DAKO A/S, Dinamarca, n.º A0001 (1/100)). Debido a la alta pureza, no pudo detectarse albúmina en el producto analizado de la presente invención.

Contenido de monómeros y dímeros de IgG

- 25 El contenido de monómeros y dímeros de IgG puede analizarse mediante cromatografía de permeación en gel y monitorizarse a partir del cromatograma mediante integración de las áreas de los picos de monómero y de dímero, véase Ph. Eur. Los resultados de los diversos análisis se enumeran en la tabla anterior, a partir de la cual parece 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 presente invención.

Contenido de polímeros y agregados

- 35 La presencia de polímeros y agregados se sabe que provoca graves efectos adversos, a menudo síntomas similares a la gripe. Debido al muy alto grado de pureza alcanzado por el proceso de producción bastante suave, el producto de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante el proceso de la presente invención está en gran medida libre de polímeros y agregados.

- 40 Los polímeros pueden analizarse por 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 tal como se describe en la Ph. Eur.

- 45 Según la Ph. Eur. y otras directrices, el contenido de agregados de proteína debe ser preferiblemente menor del 3%. El producto del presente proceso no contiene cantidades medibles de agregados y, por tanto, se considera que tiene menos del 0,1% de polímeros y agregados.

Actividad anticomplementaria (AAC) y actividad activadora de prekalicreína (APK)

La AAC y APK se miden tal como se describe en la Ph. Eur.

- 50 La AAC debe ser preferiblemente tan baja como sea 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 presente invención es de aproximadamente el 30%, es decir comparable al de los otros productos analizados. Debe observarse que la presencia de albúmina tiende a suprimir el consumo de complemento (observación del inventor).

La APK, si está presente en cantidades sustanciales, es esencial para el efecto adverso hipotensor del producto. Por tanto, la APK debe ser preferiblemente tan baja como sea posible en un producto de inmunoglobulina. Según la Ph. Eur., debe ser <35 UI/ml cuando se mide tal como se explica resumidamente en la Ph. Eur. La APK del producto de la invención, así como de los demás productos analizados, es menor que el nivel de cuantificación del método, es decir, por abajo de 8,5 EI/ml.

Hemaglutininas

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

Según los requisitos de la Farmacopea, el contenido de hemaglutininas debe ser más bajo que el que provoca la aglutinación de eritrocitos A/B en una dilución 1:64 del producto de inmunoglobulina. Todos los productos analizados cumplen este requisito.

Función de Fc

La conservación de las actividades de unión al antígeno es esencial para las funciones biológicas de las IGIV. Esto también es cierto para las actividades inmunomoduladoras. Por otro lado, la conservación de la función de Fc es esencial para el efecto de las IGIV sobre diversas células fagocíticas y la activación del sistema del complemento. La función de Fc puede demostrarse usando diversas técnicas, pero una metodología aceptada y descrita en la Ph. Eur. mide el potencial de activación del complemento de los anticuerpos en la preparación contra antígeno de rubéola. La actividad se compara con la de una preparación biológica de referencia (BRP, Ph. Eur.) de inmunoglobulinas, establecida como el 100%. El producto cumple con la prueba y la actividad relativa es de más del 60% de la de la preparación de referencia. Parece que la función de Fc del producto de la presente invención se conserva muy bien, particularmente en comparación con el otro producto líquido analizado, lo más probablemente debido al suave proceso de purificación.

Distribución de subclases

La distribución de subclases de IgG se mide mediante un método de inmunodifusión de Mancini convencional, esencialmente tal como se describe por A. Ingild (Scand J Immunol, (1983), 17, 41). Las concentraciones se determinan mediante el uso de un suero de referencia de la OMS (67/97). Se requiere que la distribución de subclases debe estar dentro del intervalo del plasma humano normal con una mediada 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 tanto, la distribución de subclases de todos los productos es aceptable.

Contenido de IgA

Se sabe que la presencia de IgA provoca potencialmente sensibilización de receptores deficientes en IgA. Si un paciente deficiente en IgA recibe una preparación de inmunoglobulina que contiene IgA, la IgA puede considerarse como un antígeno foráneo y el resultado puede ser la inducción de anticuerpos contra IgA en el receptor. La siguiente vez que se infunde una preparación que contiene IgA al paciente, puede provocarse una reacción anafiláctica. Por tanto, es esencial que la preparación de inmunoglobulina contenga tan poca IgA como sea posible. La IgA en un producto de IGIV puede monitorizarse utilizando una técnica de ELISA, por ejemplo en donde se usa un anticuerpo policlonal anti-IgA para capturar la IgA y se usa un anticuerpo anti-IgA marcado para la detección de la IgA unida. Se construyen patrones mediante diluciones de un calibrador (n.º X908, DAKO A/S, Dinamarca) con un contenido declarado de IgA.

El producto del proceso descrito en el ejemplo 1 contiene menos de 2 mg de IgA/L, que es un contenido de IgA considerablemente más bajo que el de los demás productos líquidos analizados. Las similitudes fisicoquímicas entre IgG e IgA dificultan la separación de estas inmunoglobulinas durante un proceso de purificación. Sin embargo, las dos cromatografías de intercambio aniónico/catiónico en el proceso reducen el contenido de IgA hasta un nivel muy bajo.

Contenido de IgM

En una preparación de Ig, puede monitorizarse IgM utilizando una técnica de ELISA, por ejemplo en donde se usa un anticuerpo policlonal anti-IgM para capturar IgM y se usa un anticuerpo anti-IgM marcado para la detección. Se construyen patrones mediante diluciones de un calibrador (n.º X908, DAKO A/S, Dinamarca) con un contenido

declarado de IgM. Parece a partir de la tabla que el contenido de IgM del producto de la presente invención es muy bajo y es notablemente más bajo que el del otro producto líquido.

Tween 80, TNBP y PEG

El Tween 80, TNBP y PEG se miden mediante procedimientos convencionales. En general, el contenido de estos aditivos debe ser tan bajo como sea 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 dilución, 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 este requisito. La concentración de proteínas se mide mediante el método de Kjeldahl.

Estabilizadores de maltosa y glucosa

Se usan comúnmente sacáridos como estabilizadores de productos de inmunoglobulina, tienen buenas propiedades de estabilización y se excretan rápidamente. El contenido de maltosa, sacarosa y glucosa se determina utilizando un kit comercial (Boehringer Mannheim, Alemania) con maltosa como referencia.

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

EJEMPLO 3

RESULTADOS DE ENSAYOS CLÍNICOS

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

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

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

Como medida de seguridad, se determinaron las transaminasas séricas, creatinina sérica y marcadores de virus en todos los pacientes. Se realizó el seguimiento de cinco pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática para marcadores de virus, renales y de seguridad hepática durante hasta un total de 24 semanas.

Farmacocinética

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

Efecto

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

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

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, hasta $\geq 50 \times 10^9/l$ después del tratamiento. El aumento en el recuento de plaquetas y la duración de la remisión en los pacientes individuales fueron del mismo nivel que tras la administración de la misma dosis de otros medicamentos IGIV, en los casos en los que la comparación era posible. Un paciente que recibió IGIV por primera vez no respondió al fármaco de prueba. Una reacción a IGIV de este tipo no es infrecuente y, por tanto, no es sorprendente. Los detalles de la elevación de las plaquetas y la duración de la elevación están estudiándose.

La conclusión es que la inmunoglobulina SSI líquida es tan efectiva como otros medicamentos de IGIV en el tratamiento del recuento de plaquetas bajo en pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática crónica.

Según los médicos y 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 se toleró por los pacientes igual de bien que se toleraron los otros productos de IGIV.

Seguridad

Aparte de un acontecimiento adverso grave, esplenectomía que el investigador evaluó que no tenía relación con el fármaco de prueba, sólo se han registrado eventos adversos menores. Estos efectos adversos fueron principalmente cefalea con fiebre y vómitos. Hasta la fecha no ha habido informes de signos vitales anómalos durante las infusiones de IGIV SSI. No se han registrado seroconversiones virales. No ha habido reportes de daños hepáticos o renales ni casos de choques anafilácticos.

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

EJEMPLO 4

RESULTADOS DE ESTUDIOS DE ESTABILIDAD PARA IGIV LÍQUIDA

Con el fin de someter a prueba si el producto de IGIV líquido es estable con el tiempo, se realizó un estudio de estabilidad en condiciones reales y tiempo real. Se incluyeron un total de 4 lotes consecutivos (250 ml de cada muestra) del producto de IGIV en el estudio y se almacenaron a entre 2-8°C durante al menos 12 meses. Se analizaron las muestras de los cuatro lotes a tiempo cero, a los 6 meses de almacenamiento y a los 12 meses de almacenamiento. Los resultados del estudio se presentan a continuación como medias de 4 lotes.

	0 meses de almacenamiento	6 meses de almacenamiento	12 meses de almacenamiento
Aspecto	Ligeramente opalescente e incoloro	Ligeramente opalescente e incoloro	Ligeramente opalescente e incoloro
Contenido de monómeros+dímeros	100%	99,6%	99,5%
polímeros+agreg.	<0,1 %	<0,1 %	<0,1 %
ACA	39,7%	38,2%	37,3%
PKA	<8,5 EI/ml	<8,5 EI/ml	<8,5 EI/ml
	0 meses de almacenamiento	6 meses de almacenamiento	12 meses de almacenamiento
Función de Fc	107%	113%	111%
Distribución de 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 de subclases			
IgG4	1,8%	1,6%	1,7%
pH	5,5	5,5	5,5
Composición de proteínas (% de IgG)	99,8%	99,7%	99,1%

Concentración de proteínas totales	48,8 g/l	48,3 g/l	49,2 g/l
Osmolalidad	348 mOsm/kg	347 mOsm/kg	350 mOsm/kg

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

- 5 La observación de que el contenido de monómeros y dímeros es constante a lo largo un periodo de 12 meses, indica que no se forman polímeros en la muestra. Se sabe que la presencia de polímeros de inmunoglobulina, entre otras cosas, provoca graves efectos adversos, a menudo síntomas similares a la gripe. Debido a la muy alta estabilidad del producto de inmunoglobulina que puede obtenerse mediante el proceso de la invención, el producto está en gran medida libre 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 se han incluido en este estudio de estabilidad lotes que expresan deliberadamente una AAC bastante alta. Si se observa un incremento de AAC, podría indicar que podrían estar formándose agregados durante el almacenamiento. Por tanto, la AAC constante con el tiempo indica que se están formándose agregados.
- 15 Los resultados indican además que no se desarrolló actividad activadora de prekaliceína durante el almacenamiento del producto, ya que la actividad APK no aumenta. Sin embargo, debe observarse que los valores medidos están por abajo del nivel de cuantificación inferior.
- 20 La medición de la función de Fc indica que la presencia de IgG funcional intacta se mantiene durante el almacenamiento. Por tanto, no hay proteasas presentes en las muestras, ya que habrían degradado las proteínas y por tanto disminuido la función de Fc. No ha tenido lugar tampoco desnaturalización de moléculas IgG, ya que esto habría disminuido la actividad de unión a antígeno.
- 25 Como sabrán los expertos en la técnica, podría haber diferencias en la estabilidad de las diversas subclases de IgG. Tal como puede observarse a partir de los presentes resultados, todas las subclases se mantienen durante el almacenamiento, indicando que el producto es estable. Esto está respaldado adicionalmente por el hallazgo de que la composición de proteínas de IgG en las muestras con aproximadamente la misma concentración de proteínas totales casi no cambió con el tiempo, indicando que no existe una degradación global de la IgG, es decir, el producto de la presente invención es estable y puede almacenarse durante al menos 12 meses a 2-8°C sin cambios significativos de sus características y, mediante esto, se demuestra su eficacia y su seguridad.
- 30

EJEMPLO 5

35 ETAPAS DE REDUCCIÓN DE VIRUS VALIDADAS EN EL PRESENTE PROCESO DE IGIV

ELIMINACIÓN DE VIRUS MEDIANTE UNA ETAPA DE REPARTO

- 40 Precipitación de los virus presentes en la disolución de inmunoglobulina mediante polietilenglicol. Se han realizado estudios de validación de virus empleando dos virus pequeños sin envuelta, obteniéndose las siguientes reducciones de virus:

eliminación de 6,3 log₁₀ del virus de la hepatitis A (VHA)

- 45 eliminación de 7,2 log₁₀ del virus de la polio.

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

- 50 eliminación de 7,6 log₁₀ de VIH

eliminación de 7,5 log₁₀ de BVDV

INACTIVACIÓN DE VIRUS MEDIANTE UNA ETAPA DE TRATAMIENTO CON S/D

- 55 Tratamiento de la disolución de inmunoglobulina con Tween 80 al 1% + TNBP al 0,3%, a 25°C durante ≥ 6 horas.

Se han realizado estudios de validación de virus empleando 4 virus con envuelta, obteniéndose las siguientes reducciones de virus:

- 60 inactivación de 7,4 log₁₀ de VIH

inactivación de 5,3 log₁₀ de virus Sindbis

inactivación de 4,1 log₁₀ de BVDV

5 inactivación de 5,1 log₁₀ de PRV

10 Se han realizado un total de 8 estudios de validación en dos etapas diferentes en el proceso de la presente invención. La etapa de precipitación con PEG se ha validado como 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 BVDV como modelo para el virus de la hepatitis C. Estos estudios demostraron que los cuatro virus se eliminaron eficazmente mediante precipitación con PEG. La etapa de precipitación con PEG se valida por tanto como una etapa de eliminación de virus eficaz. El tratamiento con S/D se ha validado 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 inactivó eficazmente los cuatro virus. Por tanto, el tratamiento con S/D se valida como una etapa eficaz de inactivación de virus. Ambas etapas de reducción en el proceso de IGIV, la eliminación mediante precipitación con PEG y la inactivación mediante tratamiento con S/D, se han validado eficazmente para eliminar e inactivar cuatro virus diferentes cada una. Los factores de reducción acumulativos de VIH y BVDV en el proceso son 15 y 11,6, respectivamente. Por todo esto, el producto del presente proceso puede considerarse como seguro con respecto a los virus.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Producto de inmunoglobulina G (IgG) líquido derivado de plasma en bruto o de una fracción de proteína plasmática en bruto, que tiene las siguientes características:
- a) una pureza de más del 95%,
- b) un contenido de monómeros y dímeros de IgG de al menos el 95% y,
- 10 c) un contenido de IgA de menos de 6 mg de IgA/l
- en el que la concentración de IgG es del 1-20% en peso.
- 15 2. Producto de IgG según la reivindicación 1, en el que la pureza es de al menos el 97%.
3. Producto de IgG según la reivindicación 2, en el que la pureza es de al menos el 98%.
- 20 4. Producto de IgG según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el contenido de monómeros y dímeros de IgG es de al menos el 97%.
5. Producto de IgG según la reivindicación 4, en el que el contenido de monómeros y dímeros de IgG es de al menos el 98%.
- 25 6. Producto de IgG según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el contenido de IgA es de menos de 4 mg de IgA/l.
7. Producto de IgG según la reivindicación 6, en el que el contenido de IgA es de menos de 3 mg de IgA/l.
- 30 8. Producto de IgG según la reivindicación 7, en el que el contenido de IgA es de menos de 2 mg de IgA/l.
9. Producto de IgG según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que no comprende albúmina como estabilizador.
- 35 10. Producto de IgG según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que no comprende detergente no iónico, PEG o albúmina como estabilizador.
11. Producto de IgG según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pH está en el intervalo de 5,1-5,7.
- 40 12. Producto de IgG según cualquier reivindicación anterior, en el que la concentración de IgG es del 5% o el 10% en peso.
13. Producto de IgG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la concentración de IgG es del 12%, el 14%, el 16%, el 18% o el 20% en peso.
- 45 14. Producto de IgG según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que contiene menos del 1,5% de polímeros y agregados.