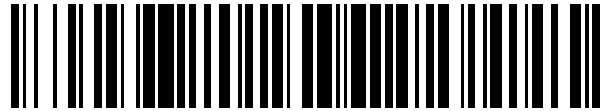


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 605**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 9/08** (2006.01)

**A61L 2/10** (2006.01)

**C07K 16/06** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2011 E 11715567 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2560682**

54 Título: **Preparaciones de anticuerpos**

30 Prioridad:

**22.04.2010 GB 201006753**

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

**20.11.2015**

73 Titular/es:

**BIOTEST AG (100.0%)  
Landsteinerstr. 5  
63303 Dreieich, DE**

72 Inventor/es:

**MÖLLER, WOLFGANG;  
RUDNICK, DIETER;  
MANEG, OLIVER;  
RODEMER, MICHAEL;  
GERMER, MATTHIAS y  
BRAUN, VEIT**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 551 605 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Preparaciones de anticuerpos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una preparación de anticuerpos (inmunoglobulina) que comprende IgM que tiene una actividad que activa el complemento específico pero baja capacidad de activación del complemento no específico. La presente invención también se refiere al uso de la preparación de anticuerpos en medicina.

10

**Antecedentes de la invención**

En la técnica se conocen composiciones de inmunoglobulinas preparadas a partir de plasma humano y que son adecuadas para la administración intravenosa y durante varias décadas han jugado un importante papel en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades. Las inmunoglobulinas se utilizan, por ejemplo, en el tratamiento de infecciones en seres humanos y se pueden asignar a varias clases con diversas propiedades bioquímicas y fisiológicas. La inmunoglobulina G participa en la defensa contra antígenos víricos, mientras que IgM es predominantemente activa en las respuestas inmunes antibacterianas y antitoxinas.

15

20

Las soluciones de inmunoglobulinas comprenden IgG, IgA e IgM en diversos porcentajes, con diferentes preparaciones que tienen diferentes aplicaciones de tratamiento, por ejemplo, se usan preparaciones con un mayor porcentaje de IgM en la profilaxis o el tratamiento de infecciones bacterianas.

25

Las soluciones de inmunoglobulinas se preparan usualmente a partir de fracciones de plasma o suero sanguíneo, por ejemplo, fracciones de Cohn. Estas fracciones se someten a continuación a numerosas etapas de purificación para eliminar contaminantes tales como virus, proteínas desnaturalizadas, proteasas y lípidos.

30

El plasma humano para fraccionamiento se recoge a partir de miles de donantes y puede contener virus patógenos a pesar de someter a ensayo totalmente la fuente de plasma. Por tanto, son esenciales las etapas de proceso para inactivar o eliminar virus a fin de conseguir productos seguros para el uso en medicina. Se conocen en la materia algunas técnicas para la inactivación/eliminación vírica, por ejemplo, tratamientos clínicos, irradiación con UVC luz o filtración nanométrica, que se llevan a cabo para garantizar la seguridad total del virus. La capacidad de las etapas de proceso para la eliminación o inactivación vírica se valida usando modelos a escala laboratorio del proceso de producción y para cada etapa se determina un factor de eliminación o inactivación. Un aumento del factor de eliminación / inactivación proporciona seguridad vírica adicional al producto farmacéutico. Actualmente, las directrices de los organismos reguladores requieren al menos dos etapas eficaces contra los virus con envoltura y sin envoltura en la fabricación de compuestos farmacéuticos derivados de plasma. Aunque algunos métodos, tales como el tratamiento con disolvente/detergente, tratamiento con ácido octanoico, filtración nanométrica y tratamiento térmico, son eficaces para inactivar o eliminar los virus con envolturas, existen solo unos pocos métodos conocidos para inactivar o eliminar los virus sin envoltura, por ejemplo los parvovirus. Estos virus sin envoltura son principalmente muy pequeños, usualmente pasan a través de los filtros nanométricos con tamaños de poro superior a 20 nm. Este tamaño de poro es demasiado pequeño para moléculas de IgM que tienen un diámetro de hasta 30 nm. Los virus sin envoltura se inactivan eficazmente mediante agentes químicos del tipo  $\beta$ -propiolactona que, sin embargo, conducen también a una inmunoglobulina modificada con funciones afectadas. Otro tratamiento eficaz es la irradiación con UVC (documento EP1842561, CAF-DCF). Sin embargo, los tratamientos conocidos con disolventes/detergentes, el tratamiento con ácido octanoico y los tratamientos térmicos suaves no tienen sustanciales efectos sobre los virus sin envoltura.

35

40

45

50

55

Tal como se ha mencionado anteriormente, además de los virus que están potencialmente presentes, es también necesario eliminar otros contaminantes como lípidos, proteasas, agregados de proteínas, e inmunoglobulinas desnaturalizadas. La eliminación de todos estos contaminantes es esencial (1) para asegurar que el producto cumple con las directrices de seguridad biológica con respecto a la contaminación vírica, (2) para que el producto sea tolerado por el paciente tras la administración intravenosa, (3) para permitir que el producto sea estable durante el almacenamiento a largo plazo (cualquier actividad proteolítica residual puede conducir a la degradación del producto durante el almacenamiento a largo plazo, por ejemplo, 2 años), y (4) para generar la mezcla de compuesto / composición farmacéutica deseada.

60

65

Al mismo tiempo, sin embargo, es esencial que las etapas de purificación eliminen los contaminantes no interfieran con las moléculas de inmunoglobulina, de manera que en la medida de lo posible estas retengan su actividad biológica normal y sean retenidas con un elevado rendimiento en solución. Este equilibrio es difícil de conseguir ya que muchas etapas de purificación conocidas pueden tener también un impacto negativo sobre la actividad de las inmunoglobulinas, y en particular sobre la IgM; por ejemplo, tiempos de irradiación prolongados con UVC pueden reducir el rendimiento de la IgM natural activa en la solución final de inmunoglobulina. No solo esto conduce a una reducción en la eficacia de la solución final de inmunoglobulina sino que también da lugar a que la solución sea menos bien tolerada in vivo.

Los agregados e inmunoglobulinas desnaturalizadas, cuya cantidad puede aumentarse mediante determinadas etapas de purificación, son especialmente un riesgo potencial para los pacientes debido a que tienen una elevada capacidad de activar de forma inespecífica el complemento, dando lugar a graves efectos secundarios en pacientes que reciben estas inmunoglobulinas desnaturalizadas. La activación inespecífica del complemento se refiere al inicio de la cascada del complemento en ausencia de complejos específicos de anticuerpo-antígeno. Debe evitarse estrictamente la activación inespecífica del complemento porque puede producir efectos secundarios indeseables tales como hipotensión, enrojecimiento, cefalea, fiebre, escalofríos, náuseas, vómito, dolor muscular, disnea y taquicardia. La activación específica del complemento, por otra parte, es deseable y se produce solo después que las inmunoglobulinas se han unido a sus antígenos específicos.

La activación inespecífica del complemento se mide por la denominada actividad anticomplementaria (ACA) mediante un ensayo normalizado descrito en la Farmacopea Europea.

Se conoce bien el papel del sistema del complemento en la defensa inmune de los patógenos. El sistema del complemento consiste en aproximadamente 20 proteínas, que se activan secuencialmente. La ruta clásica del complemento requiere normalmente un complejo específico de antígeno-anticuerpo para la activación, mientras que la ruta alternativa puede activarse mediante antígenos sin la presencia de anticuerpos. La ruta clásica y la ruta alternativa de activación del complemento generan una proteasa C3-convertasa. La C3-convertasa escinde y activa el componente C3, creando C3a y C3b, y produciendo una cascada de acontecimientos de escisión y activación adicionales sobre la C5 convertasa a C5a y C5b. C5b inicia la ruta de ataque a la membrana, que da como resultado el complejo de ataque a la membrana, consistente en C5b, C6, C7, C8, y C9 polimérico. Este es el producto final citolítico de la cascada del complemento que forma un canal transmembrana, que produce una lisis osmótica de las células diana como las bacterias.

La activación del complemento da como resultado adicionalmente la formación de anafilatoxinas, que incluyen la proteína C5a biológicamente activa. Esta anafilatoxina es un potente agente quimiotáctico de las células inmunes e inflamatorias e induce la activación celular y produce la liberación de la histamina de los mastocitos. En situaciones de activación excesiva o incontrolada y/o inespecífica del complemento, la producción en exceso de C5a puede dar lugar a efectos perjudiciales en los pacientes.

C5a es un eficaz quimioatractivo de leucocitos, que produce la acumulación de glóbulos blancos, especialmente granulocitos neutrófilos, en los sitios de activación del complemento. C5a activa los glóbulos blancos y es un poderoso mediador inflamatorio. Aunque estas funciones son beneficiosas durante las reacciones específicas del complejo anticuerpo-antígeno, ha de evitarse la generación de C5a debido a los potenciales efectos secundarios.

La activación inespecífica del complemento es un riesgo concreto para las preparaciones de inmunoglobulina IgM (es decir, las que comprenden al menos un 5% de IgM) que, a diferencia de las preparaciones de IgG, agrega fácilmente anticuerpos IgM en solución. Las preparaciones de IgM son difíciles de estabilizar especialmente si están enriquecidas en comparación con las concentraciones plasmáticas y se almacenan en solución líquida. Se sabe también que IgM es un potente activador del complemento; una única molécula unida a un antígeno puede activar el complemento. En esto se diferencia de la IgG, donde dos o más moléculas de IgG deben unirse a un antígeno bien asociadas entre sí para activar el complemento.

Además, las principales indicaciones tratadas mediante las preparaciones de inmunoglobulina que contienen IgM son infecciones bacterianas y septicemia. Como estos pacientes ya padecen hipotensión, una generación no deseada adicional de activación inespecífica del complemento y C5a conduciría a un empeoramiento clínico de la dolencia del paciente. De acuerdo con ello, se ha descrito que las preparaciones de IgM son difíciles de preparar para aplicación intravenosa.

Existen varios métodos descritos en la materia para la producción de preparaciones de inmunoglobulina que contienen IgM a partir de plasma humano.

Se ha llevado a cabo la purificación inicial de soluciones de IgM humanas mediante métodos clásicos de fraccionamiento de plasma de Cohn con alcohol frío o sus modificaciones bien conocidas (por ejemplo, Cohn/Oncley, Kistler/Nitschmann). Mediante el uso de procesos de precipitación con etanol frío, se recupera la fracción de IgM en la fracción III o la fracción I/III (denominada también B o B+I). Se han descrito métodos que, partiendo de la fracción III o I/III, purifican soluciones de proteínas enriquecidas en IgM. El documento EP0013901 describe un método de purificación que parte de la fracción III incluyendo etapas que utilizan ácido octanoico, tratamiento con  $\beta$ -propiolactona y una etapa de adsorción que utiliza una resina de intercambio aniónico. Este método se utiliza para producir Pentaglobin<sup>®</sup> -hasta la fecha, el único producto de IgM intravenoso comercialmente disponible.  $\beta$ -propiolactona es un compuesto químico bien conocido utilizado en las etapas de esterilización para inactivar virus que están potencialmente presentes. Como la  $\beta$ -propiolactona es una sustancia muy reactiva que produce la modificación química de las proteínas, se produce también una pérdida sustancial de las actividades antivirales y antibacterianas de las inmunoglobulinas. Por otra parte, esta modificación química da como resultado una actividad anticomplementaria reducida en comparación con la inmunoglobulina químicamente sin modificar. El documento EP0352500 describe la preparación de un concentrado de IgM para su aplicación intravenosa con una

actividad anticomplementaria reducida utilizando la cromatografía de intercambio aniónico,  $\beta$ -propiolactona, irradiación con luz ultravioleta y una etapa de incubación a temperatura elevada (40 °C a 60 °C). La preparación producida mediante este método era estable en solución líquida durante un tiempo limitado debido a la modificación química. La concentración de IgM estaba por encima del 50% del contenido total de inmunoglobulina.

5 Se ha descrito la preparación de soluciones de proteína enriquecidas en IgM sin modificación química mediante la  $\beta$ -propiolactona en los documentos EP0413187 (Biotest) y EP0413188 (Biotest). Estos métodos implican someter una solución de proteína adecuada a tratamiento con ácido octanoico y cromatografía de intercambio aniónico, partiendo de la fracción III o II/III de Cohn. En la patente EP0413187 (Biotest) el tratamiento con ácido octanoico se lleva a cabo agitando durante 15 min, para eliminar los lípidos que están presentes en la fracción III de Cohn.

10 La preparación de acuerdo con el documento EP0413187 tuvo una baja actividad anticomplementaria, entre 0,6 y 0,8 CH50/mg de proteína, pero tuvo que estabilizarse, e inactivarse los virus mediante la  $\beta$ -propiolactona. La baja actividad anticomplementaria se considera que es  $\leq 1$  CH50/mg de proteína de acuerdo con la monografía de la PE sobre inmunoglobulinas.

15 El documento EP0413188B1 (Biotest) describe la preparación de una preparación enriquecida en IgM para administración intravenosa utilizando cromatografía de intercambio aniónico para reducir la actividad anticomplementaria. Adicionalmente se ha descrito un tratamiento térmico a pH 4 - 4,5 a 40 a 60°C, preferentemente entre 50 y 54°C, para reducir la actividad anticomplementaria. Esta preparación debe liofilizarse para garantizar la estabilidad de la preparación durante varios meses. No se pudo demostrar la estabilidad a largo plazo en forma de solución líquida.

20 M.Wickerhauser et al. "Large Scale Preparation of Macroglobulin", Vox Sang 23, 119-125 (1972) mostraron que las preparaciones de IgM aisladas mediante precipitación de PEG tenían una actividad anticomplementaria alta (ACA) mediante un ensayo normalizado de fijación del complemento, y esta actividad ACA se redujo 10 veces incubando la preparación de IgM a pH 4,0 a 37°C durante 8 horas seguido por reajuste a pH neutro. No se ha demostrado si esta reducción de 10 veces es suficiente para asegurar la tolerabilidad intravenosa. Los autores no evaluaron el potencial específico de activación del complemento de su concentrado de IgM, ni evaluaron la seguridad en ningún modelo animal o humano.

25 Otro método describe el uso de un tratamiento térmico suave de las preparaciones de IgM a 40 a 62°C, preferentemente de 45 a 55°C, a pH 4,0 a 5,0 (documento EP 0450412, Miles) para reducir la activación inespecífica del complemento. En esta solicitud de patente se añade ácido octanoico a la suspensión de la fracción III de Cohn a fin de eliminar el activador precalicreína y las lipoproteínas mediante centrifugación. Sin embargo, este tratamiento térmico suave ocasiona la pérdida parcial de los determinantes antigénicos de IgM. Esto puede aumentar el riesgo de generar nuevos antígenos que conduce a un aumento de la inmunogenicidad en seres humanos o a la pérdida de la actividad.

30 Se ha descrito en el documento EP0835880 (US 6136312, ZLB) la preparación de una solución de proteína que contiene IgM para su aplicación intravenosa utilizando un tratamiento con proteasa (por ejemplo, con pepsina) tras una etapa de precipitación con ácido octanoico. El tratamiento con proteasa conduce a la fragmentación parcial de la molécula de inmunoglobulina, lo que afecta negativamente a la actividad funcional completa de las partes Fab y Fc. Por tanto, las inmunoglobulinas tratadas con proteasa no se pueden considerar como no modificadas. Análogamente, este método de preparación conduce a aproximadamente un 5% de fragmentos con un peso molecular de <100 kD.

35 Los métodos descritos para llevar a cabo el tratamiento con ácido octanoico (documentos EP0413187 y EP0835880) tienen el inconveniente de que el tratamiento con ácido octanoico no es eficaz con respecto a la eliminación y a la inactivación de virus sin envoltura, y no elimina sustancialmente toda la actividad proteolítica. En el documento EP 0345543 (Bayer, Miles) se describe una preparación de IgM muy concentrada con al menos un 33% de IgM para uso terapéutico, estando la preparación sustancialmente exenta de títulos de isoaglutinina. En esta solicitud de patente se lleva a cabo una precipitación con ácido octanoico añadiendo el ácido octanoico y se eliminan las isoaglutininas mediante cromatografía de afinidad Synsorb. La preparación final se debe criodesecada.

40 En conjunto, es posible producir una preparación que contiene IgM con una baja actividad anticomplementaria si las inmunoglobulinas están química o enzimáticamente modificadas y/o purificadas adicionalmente mediante cromatografía y/o sometidas a un tratamiento térmico suave. Sin embargo, estos métodos tienen sus inconvenientes en la ausencia de eliminación vírica/inactivación vírica (y por tanto, seguridad vírica), la reducción en la cantidad de moléculas de inmunoglobulina en forma natural y/o actividad anticomplementaria residual. De este modo, sigue existiendo la necesidad de proporcionar preparaciones de inmunoglobulina que contengan IgM adecuadas para su administración intravenosa a seres humanos.

### Sumario de la invención

- En un primer aspecto, la presente invención proporciona una preparación de anticuerpos adecuada para su administración a seres humanos que comprende anticuerpos IgG IgA y al menos un 5% de anticuerpos IgM en peso de la cantidad total de anticuerpos, donde la preparación se prepara a partir de plasma humano, donde la preparación de anticuerpos tiene una actividad activadora específica del complemento, donde la preparación de anticuerpos se prepara mediante un proceso que puede eliminar más de  $3\log_{10}$  de virus sin envoltura y donde en un ensayo in vitro con suero humano adecuado para determinar la capacidad de la preparación de anticuerpos para activar el complemento inespecíficamente, la preparación de anticuerpos genera: (i) sustancialmente nada de C5a, de tal manera que la preparación de anticuerpos ajustada a una concentración de 1,72 mg/ml genera menos de 200 ng/ml de C5a después de 60 minutos del ensayo; y/o (ii) sustancialmente nada de C3a, de tal manera que la preparación de anticuerpos ajustada a una concentración de IgM de 1,72 mg/ml genera menos de 6000 ng/ml de C3a después de 60 minutos del ensayo.
- En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una preparación de anticuerpos que comprende al menos un 15% de IgM, más de un 5% de IgA y más de un 40% de IgG en porcentaje de la cantidad total de anticuerpos, y que comprende menos de un 1,5% de agregados de 1200 kDa o mayores del contenido total de inmunoglobulina que se ha determinado mediante la cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento.
- Los presentes solicitantes han encontrado de manera sorprendente que la producción de una preparación de anticuerpo IgM a partir de suero humano es posible, teniendo una actividad activadora específica del complemento y una actividad del complemento sustancialmente inespecífica. Este producto mantiene de manera ventajosa la eficacia del producto reduciendo a la vez los efectos secundarios no deseados tales como la hipotensión asociada con la activación inespecífica del complemento tras la administración intravenosa.
- Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método para producir la preparación de anticuerpos de la presente invención a partir de plasma humano que comprende las etapas de:
- (a) preparar a partir del plasma humano un fracción de plasma en forma de solución que contiene inmunoglobulinas;
  - (b) mezclar un ácido carboxílico C<sub>7</sub> a C<sub>9</sub> con la solución y tratar la solución mezclada con un agitador vibrador para precipitar las proteínas contaminantes;
  - (c) separar las proteínas precipitadas a partir de la solución para dar como resultado la composición de inmunoglobulina que contiene la IgM;
  - (d) incubar la IgM que contiene la composición de inmunoglobulina a entre pH 3,5 y pH 4,5 para formar una solución incubada;
  - (e) irradiar la solución incubada con UVC para formar una solución irradiada con UVC; y
  - (f) filtrar la solución irradiada con UVC en condiciones estériles para formar la preparación de anticuerpos adecuada para su administración intravenosa a seres humanos.
- Los presentes solicitantes han encontrado, de forma sorprendente que el uso de un agitador vibrador en la etapa donde la solución de inmunoglobulina se mezcla con el ácido carboxílico es extremadamente ventajosa. Esta etapa del método proporciona una eliminación más eficaz de proteínas no deseadas (incluyendo las proteasas) y produce un producto intermedio que es más adecuado para las etapas de procesamiento posteriores utilizadas para producir un medicamento de inmunoglobulina; el producto intermedio permite que estas etapas de procesamiento posteriores sean más eficaces. De acuerdo con ello, las etapas de procesamiento posteriores pueden ser menos rigurosas, ayudando a conseguir la preparación de anticuerpos de la presente invención que puede realizar activación específica del complemento y no realizar la activación sustancialmente inespecífica del complemento.
- En particular, la composición que contiene la inmunoglobulina IgM obtenida a partir de la etapa (c) se puede combinar con etapas de tratamiento adicionales, tal como el tratamiento en condiciones ácidas suaves y tratamiento con irradiación UVC, para producir un producto de inmunoglobulina que contiene IgM o una preparación de anticuerpos que es adecuada para su administración intravenosa y que tiene las siguientes propiedades ventajosas: tiene baja actividad anticomplementaria; reteniendo un elevado nivel de IgM natural y activa; y siendo segura contra virus y por tanto adecuada para su administración intravenosa a seres humanos. El nivel de la seguridad contra el virus conseguido con los métodos descritos en el presente documento no se ha obtenido anteriormente. Las ventajas adicionales son tener baja actividad proteolítica (y por tanto ser estable durante el almacenamiento a largo plazo) y estar químicamente sin modificar.
- Además, la presente invención proporciona una preparación de anticuerpos de la presente invención para uso en medicina. En una realización, la preparación de anticuerpos es para uso en el tratamiento de trastornos inmunológicos y las infecciones bacterianas.
- La preparación de anticuerpos de la presente invención es adecuada para su uso en un método de tratamiento que comprende administrar la preparación de anticuerpos de la presente invención a un paciente.

La presente invención se describirá ahora más detalladamente por medio de ejemplos solamente, con referencia a las figuras que la acompañan.

5 La FIGURA 1 proporciona un resumen de las etapas que se pueden utilizar para formar una preparación de anticuerpos adecuada para la administración intravenosa de acuerdo con la presente invención. La etapa de tratamiento con ácido octanoico emplea un dispositivo vibromezclador, se resaltan el tratamiento a pH 4 y el tratamiento con UVC. El material de partida se genera a partir de un proceso de precipitación con etanol frío normalizado de plasma humano.

10 La FIGURA 2 proporciona una gráfica que muestra concentraciones promedio de C5a dependientes del tiempo que se encuentran en suero humano tras la incubación con preparaciones de IgM.

15 La FIGURA 3 proporciona una gráfica que muestra concentraciones promedio de C3a dependientes del tiempo que se encuentran en suero humano tras la incubación con preparaciones de IgM.

### Descripción detallada de la invención

#### Preparaciones de anticuerpos

20 Tal como se ha descrito anteriormente, en un primer aspecto, la preparación de anticuerpos es adecuada para su administración intravenosa a seres humanos que comprende anticuerpos IgG, IgA y al menos un 5% de anticuerpos IgM en peso de la cantidad total de anticuerpos, donde la preparación se prepara a partir de plasma humano, donde la preparación de anticuerpos tiene una actividad activadora específica del complemento, donde la preparación de anticuerpos se prepara mediante un proceso que puede eliminar más de  $3\log_{10}$  de virus sin envoltura y donde en un  
25 ensayo in vitro con suero humano adecuado para determinar la capacidad de la preparación de anticuerpos para activar el complemento inespecíficamente, la preparación de anticuerpos genera: (i) sustancialmente nada de C5a, de tal manera que la preparación de anticuerpos ajustada a una concentración de 1,72 mg/ml genera menos de 200 ng/ml de C5a después de 60 minutos del ensayo; y/o (ii) sustancialmente nada de C3a, de tal manera que la preparación de anticuerpos ajustada a una concentración de IgM de 1,72 mg/ml genera menos de 6000 ng/ml de C3a después de 60 minutos del ensayo.

30 Además, en un segundo aspecto, la preparación de anticuerpos comprende al menos un 15% de IgM, más de un 5% de IgA y más de un 40% de IgG en porcentaje de la cantidad total de anticuerpos, y que comprende menos de un 1,5% de agregados de 1200 kDa o mayores del contenido total de inmunoglobulina que se ha determinado mediante la cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento.

35 La preparación de anticuerpos comprende proteínas plasmáticas humanas de las cuales al menos un 90%, preferentemente al menos un 95% se prepara a partir de inmunoglobulinas (anticuerpos policlonales). En particular, la preparación comprende las inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM donde al menos un 5% de las inmunoglobulinas son IgM. La cantidad de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM se puede determinar mediante nefelometría o mediante inmunoprecipitación de acuerdo con la Ph. Eur. 2.7.1.

40 Más preferentemente, la preparación de anticuerpos comprende al menos un 10% de IgM y más preferentemente al menos un 15% de IgM. En relación a IgG e IgA, preferentemente, la preparación de anticuerpos comprende más de un 5% de IgA y/o más de un 40% de IgG. Todos los porcentajes son porcentajes de la cantidad total de anticuerpos (por ejemplo,  $g \text{ de IgM} / (g \text{ de IgG} + g \text{ de IgA} + g \text{ de IgM}) \times 100$ ).

45 Los métodos para determinar que la preparación de anticuerpos tiene una actividad activadora específica del complemento (es decir, la capacidad de activar la cascada del complemento en presencia de antígeno) mediante la evaluación de la actividad funcional de la parte Fc de la molécula de inmunoglobulina son bien conocidos en la materia. En particular, se describe un método adecuado en el método actual de la Ph Eur de acuerdo con las Directrices Europeas ICH S6 (CPMP/ICH/302/95) que utiliza el antígeno de la rubeola. Se proporcionan a continuación datos adicionales relativos a la activación específica del complemento con referencia a la actividad biológica.

50 La preparación de anticuerpos produce la activación del complemento sustancialmente inespecífica (es decir, la activación de la cascada del complemento mediante inmunoglobulinas en ausencia de antígenos) en ensayos in vitro adecuados para determinar la activación inespecífica del complemento en suero humano normal (es decir, suero procedente de seres humanos sanos). En particular, el ensayo puede determinar la cantidad de C5a y/o C3a generada en el ensayo en la ausencia de antígeno. Tal como se ha indicado anteriormente, la activación del complemento da como resultado la producción de C5a y C3a. Como ambas proteínas están implicadas en la ruta terminal del sistema del complemento (en lugar de en cualquiera de la ruta clásica/ de la lectina o en la ruta alternativa) son particularmente útiles para determinar la activación del complemento.

65 La preparación de anticuerpos no genera sustancialmente C5a y/o no genera sustancialmente C3a cuando se usa en un ensayo in vitro adecuado con suero humano en ausencia de antígeno. Preferentemente, la preparación de

anticuerpos ajustada a una concentración de IgM de 1,72 mg/ml genera menos de 200 ng/ml de C5a después de 60 minutos del ensayo, y/o la preparación de anticuerpos ajustada a una concentración de IgM de 1,72 mg/ml genera menos de 6000 ng/ml de C3a después de 60 minutos del ensayo.

- 5 Como alternativa, o además, la cantidad de C5a y/o C3a generada por la preparación de anticuerpos en el ensayo es la misma que la cantidad de C5a y/o C3a generada en el mismo ensayo por el suero humano solo  $\pm$  70%. Preferentemente esto es después de 60 minutos del ensayo.

Se conocen en la materia ensayos adecuados. Preferentemente, el ensayo comprende las etapas de:

- 10 (a) añadir una cantidad de la preparación de anticuerpos a 100  $\mu$ l de suero humano para crear una mezcla de reacción que contiene 1,72 mg/ml de IgM e incubar la mezcla de reacción durante 60 minutos a 37°C con agitación constante;
- 15 (b) preparar una serie de diluciones de la mezcla de reacción adecuada para un ELISA;
- (c) llevar a cabo un ELISA de tipo sándwich en la serie de diluciones de la mezcla de reacción utilizando un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario dirigido contra C5a o dirigido contra C3a y una sustancia cromógena, donde el anticuerpo secundario se conjuga con una enzima y la sustancia cromógena es el sustrato de la enzima; y
- 20 (d) determinar la cantidad de C5a o C3a en la mezcla de reacción basándose en el cambio de color obtenido como resultado de poner en contacto la sustancia cromógena con la enzima unida a C5a o C3a mediante el anticuerpo secundario.

En el ELISA, la serie de diluciones se pone en contacto con los pocillos de una placa de ensayo revestidos con el anticuerpo primario. Tras la incubación, se lavan los pocillos para eliminar la muestra de dilución. A continuación se incuba el segundo anticuerpo que se une a cualquier C3a/C5a unido al anticuerpo primario en los pocillos, ya que tiene un epítipo diferente en el C3a/C5a dirigido al anticuerpo primario. Tras lavar adicionalmente para eliminar el anticuerpo secundario sin unir, se incuba el cromógeno que reacciona con la enzima conjugada con el anticuerpo secundario. Se puede medir el cambio de color resultante mediante determinaciones de densidad óptica con un fotómetro, siendo proporcional a la concentración de C5a/C3a presente en la serie de diluciones.

30 En particular, la cantidad de la preparación de anticuerpos añadida en la etapa (a) es la apropiada para crear una concentración de 1,72 mg/ml de IgM en la mezcla de reacción. Las etapas (c) y (d) pueden comprender: (i) aplicar la serie de diluciones de la mezcla de reacción de los pocillos de una placa de ensayo que se reviste con un anticuerpo primario dirigido contra C3a/C5a (es decir, "el anticuerpo de captura"); (ii) incubar la placa para permitir que el posible C3a/C5a se una al anticuerpo primario; (iii) lavar la placa para eliminar cualquier material de las diluciones no unido al anticuerpo primario; (iv) aplicar un anticuerpo secundario unido a enzima (el anticuerpo de detección) que se une también a C3a/C5a; (v) incubar la placa para permitir que cualquier anticuerpo secundario se una a C3a/C5a; (vi) lavar la placa para eliminar el anticuerpo secundario sin unir; (vii) aplicar un compuesto químico que la enzima convierte en una señal de color; y (viii) medir la absorbancia de los pocillos de la placa para determinar la presencia y la cantidad de C3a/C5a.

45 El ELISA de tipo sándwich se realiza de acuerdo con métodos bien conocidos en la materia, y/o con kits comercialmente disponibles de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De forma adecuada, y particularmente preferida, los kits del enzimoanálisis de adsorción (ELISA) comercialmente disponibles son el kit Quidel MicroVue C5a Plus EIA; A025, y el kit Quidel MicroVue C3a Plus EIA; A032.

50 La preparación de anticuerpos puede comprender menos de un 2% de agregado de 1200 kDa o superior, preferentemente menos de 1,5%. Esto se refiere al % del contenido de inmunoglobulina. Se puede determinar la cantidad de agregado mediante la cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HPSEC). Esto se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos en la materia.

55 Como alternativa, o además, se puede definir la capacidad de preparación de anticuerpos para generar la activación del complemento sustancialmente inespecífica como la actividad anticomplementaria de la preparación que es menor de 1,0 CH50/mg de proteína, más preferentemente menos de 0,75 CH50/mg de proteína. Se puede llevar a cabo el ensayo para determinar la actividad anticomplementaria a esta escala de acuerdo con el método descrito en la Farmacopea Europea (método 2.6.17, Ph. Eur. 6. Edición, 2008). Se proporcionan detalles adicionales en la sección de ensayos siguiente.

60 Preferentemente, la preparación de anticuerpos se ha preparado a partir de suero humano en ausencia de una etapa que implica la modificación química o enzimática de los anticuerpo, es decir, el proceso de producción de la preparación de anticuerpos a partir de suero humano no comprende la etapa de poner en contacto los anticuerpos con un reactivo que produciría su modificación enzimática o química. En particular, el proceso no comprende poner en contacto los anticuerpos con  $\beta$ -propiolactona, que produce la modificación química de los anticuerpos, o comprende poner en contacto los anticuerpos con pepsina, que produciría la escisión automática de los anticuerpos.

65

Como alternativa, o además, la preparación de anticuerpos se ha preparado a partir de suero humano en ausencia de una etapa que implica calentar los anticuerpos a una temperatura de 40°C o más durante 10 minutos o más. En particular, se sabe que las etapas de calentamiento pueden desnaturalizar las inmunoglobulinas y producen la agregación de la inmunoglobulina.

5 Además, preferentemente, la preparación de anticuerpos se prepara mediante un proceso que es capaz de más de  $3 \log_{10}$ , preferentemente más de  $4 \log_{10}$ , y lo más preferente más de  $5 \log_{10}$  de eliminación de virus sin envoltura, haciendo de esta manera que la preparación de anticuerpos sea segura contra virus. La preparación de anticuerpos es por tanto más segura que las preparaciones de anticuerpos de la técnica anterior, particularmente con respecto a  
10 los virus sin envoltura activos del tipo, por ejemplo, parvovirus. Esto da como resultado una preparación de anticuerpos que está sustancialmente exenta de virus, y en particular sustancialmente exenta de virus sin envoltura. Además, el método puede conseguir este nivel de eliminación/inactivación de partículas víricas sin un impacto significativo sobre la cantidad de IgM activa o sobre la actividad anticomplementaria de la preparación de anticuerpos.

15 En particular, la preparación de anticuerpos se puede preparar a partir de plasma humano mediante un proceso que comprende las etapas de:

- 20 (a) preparar a partir del plasma humano un fracción de plasma en forma de solución que contiene inmunoglobulinas;
- (b) mezclar un ácido carboxílico C<sub>7</sub> a C<sub>9</sub> con la solución y tratar la solución mezclada con un agitador vibrador para precipitar las proteínas contaminantes;
- (c) separar las proteínas precipitadas a partir de la solución para dar como resultado la composición de  
25 inmunoglobulina que contiene la IgM;
- (d) incubar la IgM que contiene la composición de inmunoglobulina a entre pH 3,5 y pH 4,5 para formar una solución incubada;
- (e) irradiar la solución incubada con UVC para formar una solución irradiada con UVC; y
- (f) filtrar la solución irradiada con UVC en condiciones estériles para formar la preparación de anticuerpos  
30 adecuada para su administración intravenosa a seres humanos.

Se prefiere que el proceso comprenda además someter la solución incubada obtenida de la etapa (d) a nanofiltración antes de la irradiación de la etapa (e). Se describen detalles adicionales y aspectos preferidos del método de producción en la siguiente sección.

35 La preparación de anticuerpos se puede administrar preferentemente a macacos a 115 mg IgM/kg de peso corporal/hora en ausencia de un 10% o más de reducción en la tensión arterial del nivel anterior al tratamiento. Tal como se ha indicado anteriormente, la activación inespecífica del complemento produce hipotensión y por tanto la ausencia de un cambio significativo en la tensión arterial indica que la activación inespecífica del complemento no se produce sustancialmente in vivo en monos sanos. Se puede medir la tensión arterial insertando un catéter de  
40 presión en la aorta abdominal inferior mediante la arteria femoral derecha.

Preferentemente, la preparación de anticuerpos comprende también anticuerpos contra uno o más de *Pneumococcus saccharide*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, y *Chlamydia*.

45 Preferentemente al menos un 90% de los anticuerpos en la preparación de anticuerpos son biológicamente activos. El término biológicamente activo significa que los anticuerpos de la preparación están en forma natural y en particular pueden activar la cascada del complemento como resultado de la unión específica a un antígeno. Se puede evaluar la actividad biológica de una preparación de anticuerpos basándose en los ensayos para determinar la actividad de titulación/unión de anticuerpos y la integridad/función de Fc conocidos en la materia. En particular, en  
50 un ensayo in vitro basado en el antígeno de la rubeola adecuado para determinar la función de Fc, la actividad de la parte Fc de los anticuerpos de la preparación de anticuerpos es la misma que la de una preparación biológica de referencia  $\pm 10\%$ , más preferentemente  $\pm 5\%$ .

La comunidad médica internacional y la comunidad de atención sanitaria utilizan preparaciones biológicas de referencia para garantizar la consistencia de los productos médicos. De este modo, se conocen y están disponibles en la técnica preparaciones biológicas de referencia adecuadas para el ensayo (por ejemplo, la Preparación de referencia de inmunoglobulina biológica (Lote N° 3). En particular, se puede llevar a cabo el ensayo de acuerdo con la Eur. Ph. 2.7.9 Ensayo de la función Fc de la Inmunoglobulina (edición actual abril 2011) que utiliza la Preparación biológica de referencia de la inmunoglobulina humana (Lote N° 3) como control, frente al cual se determina el % de  
60 actividad de la preparación de anticuerpos. Este ensayo comprende las etapas de (i) cargar glóbulos rojos del grupo 0 humano teñidos con el antígeno del virus de la rubeola para crear glóbulos rojos revestidos de antígeno; (ii) incubar una cantidad de la preparación de anticuerpos con los glóbulos rojos; añadir complemento de cobaya para comenzar la lisis de glóbulos rojos iniciada por el complemento; (iii) medir la cinética de la hemólisis mediante cambios dependientes del tiempo de la absorbancia a 541 nm; (iv) evaluar la función de los anticuerpos de la  
65 preparación de anticuerpo utilizando el cambio máximo de la absorbancia en el tiempo.



La preparación de anticuerpos tiene preferentemente también una actividad proteolítica menor que las preparaciones de anticuerpos descritas en la técnica anterior. En particular, la actividad proteolítica no es detectable en la preparación cuando se almacena a entre 2 a 8°C. Se puede medir la actividad proteolítica mediante métodos de ensayo normalizados conocidos en la materia, tales como los que usan el sustrato cromógeno que se describe en la sección de ensayos siguiente, y en el Ejemplo 6.

La preparación de anticuerpos puede comprender además un agente estabilizante, tal como glicina.

Como con las preparaciones conocidas en la materia, la preparación de anticuerpos se puede almacenar a 5±3°C. Sin embargo, debido a la eficaz purificación del método, la estabilidad de la preparación de anticuerpos es extremadamente buena. El producto final es estable en forma líquida durante al menos 3 meses, preferentemente al menos 6 meses y más preferentemente al menos dos años a 2 a 8°C, lo que significa que no existe fragmentación o polimerización de IgM por encima del 1,5% medida en HPSEC, ni aumento de la actividad proteolítica, ni disminución de la actividad del anticuerpo IgM contra *Escherichia coli* y de la actividad del anticuerpo IgM contra *Pneumococcus saccharide* de más del 25% y no existe aumento en la actividad anticomplementaria de más del 25%, quedando por debajo de 1 CH50/mg de proteína. Además, el producto final producido con el método es estable en forma líquida durante al menos 3 meses, preferentemente al menos 6 meses, y lo más preferente al menos un año a temperatura ambiente (entre 23 y 27°C) como se ha evaluado mediante los mismos criterios.

#### 20 Método de producción de preparaciones de anticuerpos

Tal como se ha descrito anteriormente, se proporciona una preparación de un anticuerpo que contiene IgM procedente de una fracción de plasma que comprende inmunoglobulinas. En particular, se proporciona un método para producir la preparación de anticuerpos descrita en la presente invención a partir de plasma humano que comprende las etapas de:

- (a) preparar a partir del plasma humano una fracción de plasma en forma de solución que contiene inmunoglobulinas;
- (b) mezclar un ácido carboxílico C<sub>7</sub> a C<sub>9</sub> con la solución y tratar la solución mezclada con un agitador vibrador para precipitar las proteínas contaminantes;
- (c) separar las proteínas precipitadas a partir de la solución para dar como resultado la composición de inmunoglobulina que contiene la IgM;
- (d) incubar la IgM que contiene la composición de inmunoglobulina a entre pH 3,5 y pH 4,5 para formar una solución incubada;
- (e) irradiar la solución incubada con UVC para formar una solución irradiada con UVC; y
- (f) filtrar la solución irradiada con UVC en condiciones estériles para formar la preparación de anticuerpos adecuada para su administración intravenosa a seres humanos.

Son bien conocidas en la materia las fracciones plasmáticas adecuadas para la preparación de composiciones farmacéuticas de inmunoglobulina, y los métodos para su producción. La fracción plasmática es preferentemente una fracción plasmática precipitada y lo más preferible una fracción plasmática precipitada obtenida mediante el proceso de fraccionamiento de Cohn o sus modificaciones bien conocidas (por ejemplo, Kistler-Nitschmann). Lo más preferible, la fracción es una fracción I/III o una fracción III (conocida también como fracción B+I o fracción B) en un fraccionamiento en etanol frío. Se prefiere que las inmunoglobulinas de la fracción plasmática comprendan al menos un 5% de IgM.

La etapa (a) comprende proporcionar una fracción plasmática en forma de solución que contiene las inmunoglobulinas. En muchos casos, la fracción plasmática que contiene las inmunoglobulinas estará en forma sólida o semisólida. De esta manera, el objetivo de esta etapa es asegurar a o poner la proteína de la fracción plasmática en solución de tal manera que esté en un estado adecuado para su mezcla con el ácido carboxílico en la etapa (b). Esta etapa puede comprender mezclar la fracción plasmática con un tampón adecuado. Preferentemente, el tampón es de molaridad baja (es decir, menos de 1 M) y tiene un pH entre 4,5 y 5,5 por ejemplo, tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 5,05±0.1. Se puede completar la mezcla utilizando un mezclador de palas o un agitador vibrador.

En la etapa (b), la solución formada en la etapa (a) se mezcla utilizando un agitador vibrador con un ácido carboxílico C<sub>7</sub> a C<sub>9</sub> para precipitar las proteínas contaminantes (por ejemplo, proteasas, virus, etc.). El ácido carboxílico puede estar ramificado y/o puede incluir sustituyentes que no alteran sustancialmente el efecto de la etapa (b). El ácido carboxílico es preferentemente ácido octanoico. El ácido carboxílico se añade preferentemente a una concentración de al menos 0,075 kg/kg de fracción plasmática, hasta una concentración de 0,2 kg/kg. Más preferentemente, el ácido carboxílico se añade a 0,8 a 0,15 kg/kg de fracción plasmática, y lo más preferible entre 0,09 kg/kg y 0,13 kg/kg. Se puede usar ácido de cualquier molaridad conveniente para proporcionar la concentración correcta.

Se puede usar cualquier tipo de agitador vibrador comercialmente disponible adecuado para el uso en la industria química/farmacéutica. Los ejemplos de agitadores vibradores adecuados están disponibles de Graber + Pfenninger

GmbH. En particular, se puede usar el vibromezclador "Labormodell Type 1" para los experimentos a escala laboratorio, y se puede usar el "Industriemixer Typ 4" para preparaciones a escala producción. Los mezcladores vibradores se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y en especial, en escenarios que los fabricantes describen como adecuados para la mezcla de soluciones que contienen proteínas. Por ejemplo, los mezcladores vibradores pueden funcionar usualmente a menos de 100 Hz con una amplitud de menos de 10 mm, por ejemplo, los presentes inventores llevaron a cabo la mezcla por vibración mediante el "Labormodell Typ 1" a escala laboratorio a 50 Hz, donde se usó un suministro eléctrico a 230 V. Se varió la amplitud de la vibración del proceso de mezcla entre 0 y 3 mm, y se usó preferentemente para la preparación de IgM la de 3 mm. En los experimentos a escala laboratorio se usaron agitadores de placas con un diámetro entre 23 mm y 65 mm. Para la producción a escala se usó un agitador de placas con un diámetro de 395 mm (diámetros de los huecos de 13,5 mm y 16 mm).

En la etapa (b), el pH de la solución mezclada está preferentemente entre 4,5 y 5,5, y más preferentemente entre pH 4,8 y pH 5,3. La etapa se puede llevar a cabo en tampón acetato de sodio, y, por ejemplo, con tampón acetato de sodio aproximadamente 0,1 M. La temperatura a la que se realiza la etapa (b) está preferentemente entre 10°C y 35°C, y más preferentemente 14 a 30°C.

El tiempo de mezcla utilizando el agitador vibrador no está particularmente limitado, pero es preferentemente de al menos de 30 minutos y no superior a 3 horas, y más preferentemente de 40 - 110 minutos. Tiempos de incubación de menos de 30 minutos pueden reducir el nivel de inactivación del virus.

En la etapa (b) se puede mezclar fosfato tricálcico con la solución de la etapa (b). Preferentemente, se añade a 0,01 a 0,02 kg/kg de fracción de plasma (que está en forma sólida o semisólida). El fosfato de calcio se puede añadir simultáneamente, por separado o secuencialmente al ácido carboxílico. Preferentemente, el fosfato tricálcico se añade al menos 20 minutos después del ácido carboxílico.

En la etapa (c), las proteínas contaminantes precipitadas en la etapa (b) se separan de la solución para dar como resultado la composición de inmunoglobulina que contiene IgM (es decir, una solución que contiene inmunoglobulina). Esta etapa de separación no está particularmente limitada y se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado conocido en la materia. Sin embargo, la etapa de separación se lleva a cabo preferentemente utilizando filtración, y más preferentemente ultrafiltración, y el resultado de la etapa (c) es por tanto una solución filtrada.

Tal como se ha descrito anteriormente, el método es ventajoso en términos de fabricación debido a que parece producir una precipitación más eficaz de las proteínas contaminantes, y, como resultado, la etapa (c) es más fácil de realizar. Cuando la mezcla resultante de la etapa (b) se separa, se consigue una solución clara transparente, es decir se consigue la composición de inmunoglobulina que contiene IgM. La filtración es por tanto más rápida y más fácil.

Se requieren etapas de proceso adicionales (d) a (f) para convertir la composición de inmunoglobulina que contiene IgM obtenida de la etapa (c) en una preparación de anticuerpos adecuada para la administración intravenosa.

La etapa (c) comprende tratar la composición de inmunoglobulina que contiene IgM obtenida de la etapa (c) en condiciones levemente ácidas, la etapa (e) comprende someter la composición tratada con ácido a irradiación UVC para formar una solución irradiada con UVC, y la etapa (f) comprende filtrar la solución irradiada con UVC en condiciones estériles para formar la preparación de anticuerpos adecuada para su administración intravenosa a seres humanos.

Para el tratamiento en condiciones levemente ácidas, la composición de inmunoglobulina que contiene la IgM obtenida de la etapa (c) se incuba a entre pH 3,5 a pH 4,5, y preferentemente entre pH 3,8 y pH 4,2, para formar una solución incubada. Se pueden crear condiciones levemente ácidas añadiendo un ácido adecuado a la composición de inmunoglobulina que contiene IgM, por ejemplo, el pH se puede ajustar añadiendo HCl 0,2 M.

Esta etapa de incubación se lleva a cabo preferentemente a entre 32 y 42°C, y más preferentemente a entre 35 y 39°C. El tiempo de incubación es preferentemente al menos de 2 horas y no mayor de 24 horas, y más preferentemente al menos de 9 horas pero no mayor de 16 horas.

En la etapa de irradiación, la solución incubada obtenida procedente del tratamiento ácido suave descrito anteriormente se trata con luz UVC para formar una solución irradiada con UVC. Esta etapa se puede llevar a cabo usando dispositivos que están comercialmente disponibles, tales como el dispositivo UViviatec® (Bayer Technology Services). Se prefiere que la solución incubada se trate a  $254 \pm 10$  nm con entre 200 y 500 J/m<sup>2</sup>, más particularmente entre 200 y 300 J/m<sup>2</sup>, para inactivar adicionalmente los virus y proteasas que están potencialmente presentes. Se indica que el tratamiento con UVC, en las condiciones suaves que se requerirían normalmente, solo es posible con el filtrado en agua transparente que se obtiene tras el tratamiento con ácido octanoico y vibromezclado. Las soluciones más opalescentes u opacas normalmente obtenidas con las técnicas de agitación convencionales necesitarían tiempos de irradiación más largos que conducirían a mayor desnaturalización de la

actividad de la IgM y menores tasas de inactivación del virus.

En la etapa (f) la solución irradiada se filtra en condiciones estériles para formar la preparación de anticuerpos adecuada para su administración intravenosa a seres humanos. Preferentemente, la filtración es nanofiltración, más preferentemente mediante un filtro que tiene un tamaño de poros de 40 a 50 nm.

Además del tratamiento ácido suave, la irradiación con UVC y la etapa de filtración, las etapas adicionales para conseguir una preparación de inmunoglobulinas para administración intravenosa puede opcionalmente comprender una o más etapas de filtración adicionales. La solución de proteínas que se procesa puede adsorberse en DEAE-Sephadex y a continuación separarse de la Sephadex mediante filtración en profundidad. Por ejemplo, puede someterse adicionalmente a adsorción discontinua con 75 mg por kg de proteína de DEAE Sephadex a pH 5,8, para eliminar la proteína ceruloplasmina acompañante no deseada.

Se prefiere particularmente que la solución incubada obtenida procedente del tratamiento ácido suave se someta a adsorción sobre DEAE-Sephadex y a continuación se separa de Sephadex mediante filtración en profundidad, antes de tratarse con irradiación UVC.

La solución de inmunoglobulina que se procesa puede filtrarse a través de un filtro nanométrico. Se pueden usar filtros de  $75 \pm 5$  nm a  $35 \pm 5$  nm de tamaño de poro, o filtros que tienen un tamaño de poro nominal de 75 a 35 nm (por ejemplo, Pall Ultipor DV50), en diversas etapas durante el proceso. (Un tamaño de poro nominal de por ejemplo, 50 nm corresponde a una tasa de retención  $\geq 4 \log_{10}$  para un virus con un tamaño de 50 nm o más). Preferentemente, la solución obtenida de la etapa DEAE-Sephadex descrita en el párrafo anterior se filtra a través de un filtro 0.2  $\mu\text{m}$  antes de la irradiación con UVC.

La preparación final de anticuerpos (es decir, la solución de inmunoglobulina que contiene la IgM procesada) obtenida a partir del proceso definido anteriormente puede introducirse en un recipiente en condiciones estériles. Como alternativa, la preparación de anticuerpos puede formularse en un tampón que contiene glicina a un pH entre 4 y 5,5, y preferentemente entre 4,1 a 4,5. La preparación de anticuerpos puede también diluirse a una concentración de proteínas entre 40 y 80 g/l y preferentemente entre 55 y 70 g/l. Se indica que es también posible enriquecer el contenido en IgM de la preparación de anticuerpos mediante métodos bien conocidos como, por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico.

Tal como se ha indicado anteriormente, el método descrito anteriormente conduce a una inactivación y eliminación de partículas víricas superior, especialmente los virus sin envoltura tales muy resistentes tales como parvovirus, que no suelen ser muy susceptibles al tratamiento con ácido octanoico. Además, se consigue una eliminación mejorada de la actividad proteolítica en comparación con la agitación convencional. Estas características se consiguen manteniendo a la vez un elevado rendimiento de la IgM que está químicamente sin modificar. Este hallazgo contrasta con la visión convencional de que el tratamiento con ácido octanoico no es una etapa eficaz frente a virus sin envoltura y se puede conseguir una seguridad vírica mejorada mediante la inactivación de virus mediante métodos rigurosos tales como el tratamiento con  $\beta$ -propiolactona. Análogamente, es bien sabido que aumentar, por ejemplo, la concentración de ácido octanoico para eliminar completamente la actividad proteolítica da como resultado una pérdida masiva de IgM.

Los resultados del método se consiguen mediante el uso de dispositivos de mezcla que utilizan un modo vibrador en combinación con el tratamiento con ácido octanoico. Esto es particularmente sorprendente ya que se sabe que la IgM es muy susceptible al esfuerzo de cizalladura, que puede conducir a una actividad anticomplementaria muy indeseada. De acuerdo con ello, se podría considerar no utilizar un mezclador vibrador para preparar una composición de IgM y no se esperaría dicho impacto favorable utilizando un mezclador vibrador durante el procesamiento de una solución que contiene IgM.

Además, con el método de separación conseguido en la etapa (c), dicha clarificación mediante filtración de la solución tratada con ácido octanoico resultante de la etapa (b) queda potenciada cuando se usa un dispositivo mezclador vibrador. La separación se consigue más fácilmente, reduciendo el tiempo de procesamiento y los costes de fabricación, y la etapa (c) conduce a una solución límpida que resulta una ventaja para el procesamiento posterior. Las soluciones convencionales, conseguidas filtrando los resultados de las soluciones que contienen IgM tratadas con ácido octanoico que se han agitado, son opalescentes u opacas.

La composición que contiene IgM resultante obtenida de la etapa (c) se somete preferentemente a tratamiento en condiciones ácidas suaves (por ejemplo, pH 4) y una etapa de irradiación UVC para mejorar la seguridad contra el virus y estabilizar el producto final. Debido a la clarificación mejorada de la composición de inmunoglobulina que contiene IgM obtenida de la etapa (c) es posible disminuir el tiempo de irradiación necesario con UVC para conseguir la inactivación vírica de los virus sin envoltura de más de 3 o 4  $\log_{10}$ . Esto da como resultado un mayor rendimiento de la IgM natural y activa durante el tratamiento con UVC.

Sorprendentemente, estas etapas conducen a una solución que contiene IgM sin modificar ni química ni enzimáticamente que tiene mayor rendimiento de la IgM natural y activa, que tiene baja actividad

anticomplementaria y baja actividad proteolítica y que tienen elevada actividad antivírica y antibacteriana, con una seguridad notable en lo que respecta a virus con y sin envoltura; un rasgo clave de las sustancias farmacéuticas previstas para administración intravenosa. Además, una solución que contiene IgM tratada tiene una estabilidad a largo plazo mejorada, siendo muy estable en solución líquida durante más de 12 meses a 2 - 8°C.

5

#### Uso médico

La preparación de anticuerpo es adecuada para su uso en medicina y se puede utilizar en el tratamiento de trastornos inmunes y de infecciones, especialmente en trastornos por deficiencia de IgM y en infecciones bacterianas. La preparación de inmunoglobulina polivalente humana enriquecida en IgM para administración intravenosa contiene títulos de anticuerpo más altos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas clínicamente relevantes así como títulos de anticuerpo más altos contra endotoxinas de bacterias Gram negativas y exotoxinas de bacterias Gram positivas en comparación con las preparaciones polivalentes de inmunoglobulina G.

10

15 En particular, las preparaciones de anticuerpo son adecuadas para su administración por vía intravenosa a pacientes.

Así, las preparaciones de anticuerpos son adecuadas para su uso en un método de tratamiento de un paciente que comprende una etapa de administrar la preparación de anticuerpo al paciente. En particular, el paciente puede padecer un trastorno inmune o una infección bacteriana. Las preparaciones de anticuerpo se pueden administrar por vía intravenosa.

20

#### **Ejemplos**

##### 25 Métodos de ensayo

Distribución de tamaños moleculares mediante HPLC para el concentrado de IgM

El siguiente método se puede utilizar para determinar el % de agregados en una preparación de anticuerpo (tal como se utiliza en el Ejemplo 8).

30

*Solución de ensayo:* Las muestras se inyectaron sin diluir a aproximadamente 50 g/l con un volumen de inyección de 10 µl (aproximadamente 500 µg de carga de proteína).

*Solución de referencia:* inmunoglobulina humana (por ejemplo, Intratect, Biotest AG)

*Solución de patrón:* Patrón de filtración en gel Bio-Rad (Art. n°. 151-1901)

35

*Columna:*

- tamaño: 1 = 30 mm, Φ = 7,8 mm,
- fase estacionaria: Tosoh Bioscience TSK-Gel G4000 SWXL, adecuada para fraccionamiento de proteínas globulares con masas moleculares relativas en el intervalo de 20.000 a  $7 \times 10^6$  Da.

40

*Fase móvil:* disolver 4,873 g de hidrogenofosfato disódico dihidrato, 1,741 g de dihidrogenofosfato de sodio monohidrato, 11,688 g de cloruro de sodio y 50 mg de azuda de sodio en 1 litro de agua.

*Caudal:* 0,5 ml/min

*Detección:* espectrofotómetro a 280 nm. En el cromatograma obtenido con la solución de referencia, el cromatograma se integra de acuerdo con el siguiente esquema, y se identificaron los picos:

45

- Polímero (> 1200 kD), 10 - 13 min
- IgM (1200 - 750 kD), 13 - 19 min
- Dímero / IgA (750 - 350 kD), 19 -20 min
- IgG (350 - 100 kD), 20 - 26 min
- Fragmentos (> 100 kD), 26 - 40 min
- Fragmentos (> 100 kD), 26 - 40 min

50

Determinación de la activación del complemento inespecífico

55

Eritrocitos de oveja pretratados con hemolisina se hemolizaron completamente. La hemólisis se suprimió mediante anticuerpos que se unían al complemento de la muestra. Se determinó la cantidad de complemento, que está unido (inactivado) a 1 mg de inmunoglobulina.

60

Una determinada cantidad de inmunoglobulina (10 mg) se mezcló con el complemento de cobayas, y se tituló el complemento libre. La actividad anti-complementaria se expresa como complemento usado con respecto al complemento usado de una solución de referencia. La unidad hemolítica de la actividad del complemento ( $CH_{50}$ ) es la cantidad de complemento que conduce a la hemólisis de  $2,5 \times 10^8$  eritrocitos preparados de forma óptima de una cantidad total de  $5 \times 10^8$  eritrocitos en condiciones óptimas de tampón.

65

Los eritrocitos preparados de forma óptima (8 ml de eritrocitos estabilizados de oveja, lavados tres veces con tampón de gelatina-barbital, finalmente, 1 ml de eritrocitos se suspendieron en 24 ml de tampón de gelatina-barbital) se prepararon mezclando 20 ml de suspensión de eritrocitos con 20 ml de hemolisina (ajustado a 2 MHE/ml -mínima unidad hemolítica) e incubación durante 15 min a 37°C.

5 Un equivalente de 10 mg de inmunoglobulina se diluyó en tampón de gelatina-barbital (1 g de gelatina en 1 l de tampón de barbital, pH 7,3, solución tampón de barbital 5 veces: 83 g de cloruro de sodio, 10,192 g de barbital sodio en 2 litros de agua, pH 7,3). Hasta un volumen final de 1 ml, se añadieron 200 µl de complemento 100 CH<sub>50</sub>/ ml. Los tubos de ensayo se incubaron con agitación durante 1 h a 37 °C. Las muestras se diluyeron y se titularon frente a eritrocitos preparados de forma óptima. Tras incubación durante 1 h a 37°C, las muestras se centrifugaron y la densidad óptica se determinó usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 541 nm.

#### Determinación de la actividad proteolítica

15 La actividad proteolítica se puede evaluar mezclando un sustrato cromogénico (en particular, uno sensible a al menos una serina proteasa) y una muestra de la preparación de anticuerpo (habitualmente diluida en tampón para satisfacer el intervalo lineal del ensayo) a 37°C, y realizando un seguimiento de la cinética de absorción mediante un espectrofotómetro. La actividad proteolítica de la muestra se calcula a partir de la diferencia de absorción inicial ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) mediante la ecuación  $C (U/l) = S \times \Delta\text{Abs}/\text{min} \times F$  ( $C$  = actividad proteolítica;  $S$  = factor de conversión relativo a un cambio de adsorción específico del sustrato cromogénico; y  $F$  = factor de dilución). Uso del sustrato de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En particular, la actividad proteolítica se puede evaluar mediante las siguientes etapas:

- 25 (a) 25 mg del sustrato S-2288 (Chromogenix) se disolvieron en 7,2 ml de agua para inyección;  
 (b) una muestra de la preparación de anticuerpo se diluyó con tampón (Tris.HCl 100 mM pH 8,4, NaCl 106 mM ) para satisfacer el intervalo lineal del ensayo, y la temperatura se ajustó a 37°C;  
 (c) cantidades iguales (por ejemplo, 200 µl) de la preparación de anticuerpo diluida y el sustrato disuelto se mezclaron;  
 30 (d) se midió la cinética de absorción a 405 nm durante de 1 a 3 minutos a 37°C mediante un espectrofotómetro;  
 (e) la actividad proteolítica de la muestra se calcula a partir de la diferencia de absorción inicial ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) mediante la ecuación  $C (U/l) = 313 \times \Delta\text{Abs}/\text{min} \times F$  ( $C$  = actividad proteolítica,  $F$  = factor de dilución).

35 El límite de cuantificación de este método es 8 U/l, y cuando se usa una muestra de la preparación de anticuerpo, la actividad proteolítica es indetectable. De esta forma, el nivel de actividad proteolítica en el producto final es inferior a 8 U/l.

#### Ejemplo 1 -Preparación de una preparación enriquecida en IgM a partir de la fracción I/III

40 180 kg de la fracción Cohn I/III, originada a partir del fraccionamiento en etanol frío de plasma humano se suspendieron en 720 l de tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 5,05 y se mezclaron durante 15 - 30 minutos una vez que se alcanzó la temperatura de la suspensión ( $22 \pm 4$  °C).

45 La solución se trató mediante la adición de 19,8 kg de ácido octanoico (0,110 kg por kg de pasta I/III utilizada) a temperatura ambiente, y la solución de proteína se mezcló adicionalmente durante 80 minutos, usando un mezclador por vibración (Vibromixer<sup>®</sup>, tamaño 4, Graber+Pfenninger GmbH, Vibromixer ajustado al nivel 2 - 3). El ácido octanoico se añadió lentamente durante 30 min.

50 Aproximadamente 3 kg de fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) se añadieron a lo anterior, y la solución de proteína se mezcló adicionalmente durante al menos 15 min. El precipitado se eliminó mediante filtración con clarificación usando un filtro prensa. Se llevó a cabo una filtración 0,2 mm, y la solución de proteína se sometió a ultrafiltración con membranas de 10 kD. La solución de proteína se diafiltró contra una solución de NaCl 0,04 M y después se ajustó a una concentración de proteína de 40 g/l.

55 La solución de proteína se trató a un pH  $4,0 \pm 0,1$  tras dilución 1+1 con agua para inyección. El ajuste del pH se realizó usando HCl 1 M y la solución de proteína se incubó durante 9 h a  $37 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ . Tras la incubación a pH 4, la solución de proteína se ajustó a pH 5,8, usando NaOH 1 M. La solución de proteína resultante se purificó adicionalmente mediante adición de DEAE Sephadex en modo discontinuo (75 g DEAE Sephadex por kg de proteína). La solución de proteína se incubó con agitación durante  $\geq 60$  min a temperatura ambiente. La DEAE Sephadex se eliminó mediante filtración con clarificación. La solución de proteína se sometió a una filtración 0,2 µm.

65 La solución de proteína se filtró a través de un filtro de 0,1 µm y un filtro Pall, Ultipor VF DV50, 20". El filtrado se procesó adicionalmente mediante tratamiento con luz UVC a 254 nm, usando un dispositivo de presa de flujo pistón UVivatec<sup>®</sup> (Bayer Technology Services / Sartorius Stedim) a una dosis de UVC de 240 J/m<sup>2</sup>. La velocidad de flujo a través del reactor UVC se calculó según las instrucciones del fabricante. La solución de proteína irradiada se concentró hasta una concentración de proteína de 50 - 70 g/l mediante ultrafiltración, y se sometió a diafiltración

(membrana de 10 kD, usando tampón de glicina 0,32 M pH 4,3). El producto final se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenó de 2 a 8°C.

Ejemplo 2 - investigación de las condiciones en la etapa de tratamiento con ácido octanoico

5 Para el tratamiento con ácido octanoico, se sometieron a ensayo los siguientes intervalos experimentales, también combinados entre sí usando el método descrito en el Ejemplo 1 (no se muestran los resultados).

- 10 - Cantidad de ácido octanoico: 0,09 kg/kg a 0,13 kg/kg (Cantidad de ácido octanoico por kg usado de fracción I/III) (ácido octanoico 120 a 180 mM)
- pH del tratamiento con ácido octanoico entre pH 4,8 y 5,3
- Intervalo de temperatura de la reacción: 14°C a 30°C
- Tiempo de incubación: 40 a 110 min

15 Todas las condiciones ensayadas condujeron a compuestos intermedios fáciles de clarificar para su procesamiento posterior, y con una amplia reducción de la actividad proteolítica desde varios miles de U/I en la fracción de Cohn suspendida I/III). Estos compuestos intermedios dan como resultado un producto final con una actividad proteolítica inferior a 8 U/I (calculada como se describe más adelante en el Ejemplo 6), que es el límite de cuantificación.

20 Ejemplo 3 - Reducción de virus mediante el uso de Vibromezclador -Determinación de los factores de eliminación de virus para el tratamiento con ácido octanoico con y sin el uso de un vibromezclador.

25 250 ml de fracción I/III suspendida se homogeneizaron durante 30 min a pH 5,05 y 22°C. La suspensión se enriqueció con 2,6 ml de la solución madre de virus. Se añadió ácido octanoico (110 g/kg) y se homogeneizó durante 60 min con un vibromezclador. En un experimento paralelo, la misma mezcla se homogeneizó mediante agitación convencional. Después de 60 min se añadió fosfato tricálcico (0,15 g/kg de ácido octanoico) y la suspensión se agitó durante 15 min. La suspensión se aclaró mediante filtración profunda usando un disco de filtro. El filtro de disco se preacalaró con 70 - 80 ml de tampón. Tras la filtración, el filtro de disco se enjuagó con 80 ml de tampón. El filtrado y el lavado se combinaron, y se extrajo una muestra para la titulación del virus.

30 Los títulos de virus de las muestras tomadas antes de la adición de ácido octanoico y después de la filtración se determinaron con células indicadoras adecuadas para SV40, Reo y PPV (CV-1, CCL.7.1 y PK13). Finalmente, se calculó el factor de eliminación según las directrices actuales de los estudios de validación de virus.

35 En los estudios de validación de virus, los virus sin envoltura como SV40 y Reo se eliminaron eficazmente en el orden de más de 4 log<sub>10</sub> y más de 5 log<sub>10</sub>, respectivamente. Además, el PPV se eliminó en más de 3 log<sub>10</sub>. Estos valores son más de 10 veces y hasta 1000 veces superiores que con el mismo tratamiento con ácido octanoico en condiciones de agitación convencionales sin el vibromezclado.

40 **Tabla 1: Comparación entre los factores de reducción del virus (log<sub>10</sub>) para el tratamiento con ácido octanoico con y sin el uso de un vibromezclador.**

	Reacción con ácido octanoico y agitación convencional [reducción de log <sub>10</sub> ]	Reacción con ácido octanoico y vibromezclado [reducción de log <sub>10</sub> ]
VPP	2,15 ± 0,32	3,39±0,36
REO	2,34 ± 0,38	5,46 ± 0,28
SV40	2,05 ± 0,4	4,71 ± 0,34

Ejemplo 4 - Evaluación del tratamiento con UVC

45 Se evaluó el intervalo óptimo de la dosificación de radiación UVC. Existe un equilibrio entre la dosificación mínima necesaria para conseguir una inactivación de al menos 4 log<sub>10</sub> para virus sin envoltura y la dosificación máxima tolerable para evitar la desnaturalización de las moléculas de IgM que conduce a una función Fab incorrecta para unir los antígenos y una función Fc incorrecta que afecta a la activación del complemento. En el intervalo de 200 to 400 J/m<sup>2</sup> solo puede observarse un leve aumento de los agregados de inmunoglobulina y no se observa afectación significativa sobre el contenido del fragmento.

50 Para los experimentos, la densidad óptica (DO) de la solución de proteína original se utilizó para calcular el caudal en el sistema de laboratorio UVivatec con la hoja de cálculo Excel proporcionada por el proveedor de BTS (Hoja de cálculo maestra del cliente UVivatec Lab II Versión 3.0). El caudal se calculó teniendo en cuenta el rendimiento de la lámpara, el punto de ajuste del sensor de la lámpara de la señal UV y la dosis de irradiación UVC deseada.

60 Una solución que contenía IgM con un contenido de proteína de aproximadamente 55 g/l (Lote 86GB005BE07) se bombeó a un caudal del 5,8 l/h a través del sistema UVivatec para conseguir una dosis de 200 J/m<sup>2</sup> para un único flujo pistón. Se consiguió una dosis de 300 J/m<sup>2</sup> bombeando la solución de proteína a un caudal de 3,9 l/m<sup>2</sup> a través del sistema. Se consiguieron 400 J/m<sup>2</sup> bombeando la solución de proteína a un caudal de 2,9 l/m<sup>2</sup> a través del sistema.

**Tabla 2: Resultados analíticos de la actividad y determinaciones de títulos antes y después del tratamiento con UVC en el producto final concentrado**

		Producto IgM sin irradiación UVC	Producto IgM después de 200 J/m <sup>2</sup>	Producto IgM después de UVC 300 J/m <sup>2</sup>	Producto IgM después de UVC 400 J/m <sup>2</sup>
Contenido de proteína	g/l	56,3	56,2	57,6	54,4
Contenido de IgG (nefelometría)	%	56,1	55,5	55,7	54,9
Contenido de IgA (nefelometría)	%	20,1	20,6	20,5	20,7
Contenido de IgM (nefelometría)	%	23,7	23,9	23,7	24,4
HPSEC agregados > 1200 kD fragmentos (> 100 kD)	% área	1,9	2,6	3,3	4,0
	% área	0,66	0,73	0,76	0,79
ACA	CH50/mg proteína	0,68	0,48	0,46	0,46
PA	U/l	< 8	< 8	< 8	< 8

- 5 No se pudieron observar diferencias significativas para el contenido de inmunoglobulina, actividad proteolítica o ACA en el intervalo de 200 a 400 J/m<sup>2</sup>. El intervalo preferido para la dosificación se ajustó entre 200 y 300 J/m<sup>2</sup> porque 200 J/m<sup>2</sup> era suficiente para inactivar los virus sin envolturas y a 300 J/m<sup>2</sup> no se pudo observar impacto significativo sobre la formación de agregados y los títulos de anticuerpo. La dosificación preferida es 225 J/m<sup>2</sup>
- 10 Una solución diluida que contenía IgM con un contenido de proteína de 8 a 12 g/l (Lote 86BB059BE07) se bombeó a un caudal del 5,8 l/h a través del sistema UVivitec para conseguir dosis entre 200 y 300 J/m<sup>2</sup> para un único flujo pistón.

**Tabla 3: Resultados analíticos de las soluciones de IgM antes y después de la irradiación con UVC a diferentes dosis de UVC**

Lote fracción I/III 86BB059BE07		antes UVC	UVC: 200 J/m <sup>2</sup>	UVC: 225 J/m <sup>2</sup>	UVC: 250 J/m <sup>2</sup>	UVC: 300 J/m <sup>2</sup>
Proteína	g/l	11,34	10,56	10,65	10,69	10,56
Contenido en IgG	%	59,2	59,1	58,5	58,6	57,1
Contenido en IgA	%	19,6	19,6	20,2	20,1	20,3
Contenido en IgM	%	21,1	21,3	21,2	21,4	22,6
HSEC agregados > 1200 kD	%	0,20	0,39	0,54	0,3	0,47
% fragmentos < 100 kD	%	0,47	0,46	0,25	0,26	0,47
PA	U/l	< 8	< 8	n.t.	n.t.	n.t.
PKA	U/ml	3	3	3	3	3
ACA	CH50/mg proteína	0,1	0,08	0,1	0,1	0,18
Anti-E.coli O1:K1 - IgG	U/mg	24,7	20,5	18,9	19,5	20,2
Anti-E.coli O1:K1 - IgA	U/mg	9,4	9,5	9,5	9,1	8,9
Anti-E.coli O1:K1 - IgM	U/mg	14,1	13,0	15,1	13,9	13,4
Anti-Candida albicans - IgG	U/mg	15,6	16,8	17,9	17,3	17,0
Anti-Candida albicans - IgA	U/mg	11,3	11,6	10,5	10,3	10,4
Anti-Candida albicans - IgM	U/mg	13,8	13,3	13,7	13,9	13,1
Anti-Enterococcus faecalis - IgG	U/mg	13,0	15,5	13,5	14,8	15,0
Anti-Enterococcus faecalis - IgA	U/mg	11,3	10,5	10,1	9,7	9,6
Anti-Enterococcus faecalis - IgM	U/mg	17,2	14,1	16,7	14,0	13,9

Lote fracción I/III 86BB059BE07			antes UVC	UVC: 200 J/m <sup>2</sup>	UVC: 225 J/m <sup>2</sup>	UVC: 250 J/m <sup>2</sup>	UVC: 300 J/m <sup>2</sup>
Anti-Pneumococcus -IgG	Saccharid	U/mg	23,2	24,1	24,7	24,0	25,7
Anti-Pneumococcus -IgA	Saccharid	U/mg	13,3	12,1	18,0	16,5	14,8
Anti-Pneumococcus -IgM	Saccharid	U/mg	17,5	15,1	18,0	16,4	16,6

La distribución entre las clases de inmunoglobulina sigue quedando inalterada mediante el procedimiento de irradiación con UV comprendido en este intervalo de dosificación. El modelo de distribución de pesos moleculares analizado mediante HPSEC tampoco cambia. El nivel de pureza analizado mediante CZE permanece inalterado. La actividad proteolítica (PA), el activador precalicreína (PKA) y la actividad anti-complementaria (ACA) permanece inalterada. Igualmente, la actividad antibacteriana medida por un método Elisa no se ve significativamente alterada para todas las clases de inmunoglobulinas.

Las alícuotas irradiadas con intensidades crecientes de UV- se procesaron adicionalmente hasta conseguir el producto final, y se sometió al mismo panel de ensayos analíticos. Tampoco hubo diferencia significativa observable en los productos finales. Todos los títulos de anticuerpo sometidos a ensayo estuvieron siempre en el intervalo de 100 ± 10 % de la preparación de control no tratada mediante UVC.

Example 5 - Reducción global de virus mediante el uso de Vibromezclador/tratamiento pH 4 y tratamiento con UVC - Determinación de los factores de eliminación de virus

La validación de la eliminación/inactivación de virus en tres etapas de tratamiento con ácido octanoico y vibromezclado, tratamiento a pH 4 y tratamiento con UVC (215 J/m<sup>2</sup>) se llevó a cabo usando los siguientes virus modelo: virus de la diarrea vírica de bovino (DVBV) como virus modelo del virus de la hepatitis C, el virus de la pseudorrabia (VSR) como virus modelo del virus del herpes humano, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), virus de la arteritis equina (VAE) como virus modelo de los coronavirus, virus sindbis (V Sin) como virus modelo de los Flavivirus, virus de la encefalomiелitis de murino (VEM) como virus modelo del virus de la hepatitis A, reovirus (Reo) como virus modelo de los virus sin envoltura, parvovirus porcino (PVP) como virus modelo del parvovirus humano B 19.

Los resultados de estos estudios con las tres etapas de tratamiento con ácido octanoico, tratamiento a pH 4 y tratamiento con UVC se relacionan en la siguiente Tabla 4.

**Tabla 4: Reducción total de virus mediante el proceso de producción de IgM**

Virus modelo	DVBV	VSR	VIH-1	VAE	SinV	VEM	Reo	VPP
<b>Reducción total (log10)</b>	> 12,5	> 10,1	> 12,7	> 8,4 <sup>a</sup>	>13,7 <sup>a</sup>	9,2	> 11,0	> 8,4
<sup>a</sup> Factor de reducción sin datos de validación para la etapa de validación con UVC								

La nanofiltración opcional con filtros de un tamaño nominal de poro de aproximadamente 50 nm añade seguridad adicional aumentando la reducción total en más de 17 log<sub>10</sub> dependiendo del tamaño del virus. Por ejemplo, >17,5 log<sub>10</sub> se consiguen en ese caso para el VIH-1, mientras que el PVP no se elimina adicionalmente mediante nanofiltración.

Por tanto, el procedimiento de purificación conduce a una preparación de IgM notablemente segura en lo que respecta a virus con unas tasas de inactivación/reducción de virus no conseguidas hasta este momento de dicha preparación que contiene IgM superiores a 8 log<sub>10</sub>. Esto es especialmente importante para los virus sin envoltura tales como VEM, Reo y PVP, que por lo general son más resistentes contra los procedimientos de inactivación y eliminación de virus debido a un pequeño tamaño y la carencia de una envoltura lipídica.

Ejemplo 6: Determinación de la actividad proteolítica residual para el tratamiento con ácido octanoico con y sin uso de un vibromezclador.

El tratamiento con ácido octanoico se llevó a cabo como en el ejemplo 1 y, en un experimento paralelo sin un vibromezclador pero con agitación intensa convencional con un agitador de palas. Se determinó la actividad proteolítica en las muestras después del tratamiento con ácido octanoico/fosfato tricálcico y ultra/diafiltración usando el sustrato cromogénico S-2288 (Chromogenix), siguiendo las instrucciones del fabricante. 25 mg del sustrato S-2288 (Chromogenix) se disolvieron en 7,2 ml de agua para inyección. Las muestras se diluyeron con tampón (Tris/HCl 100 mM pH 8,4, NaCl 106 mM) para satisfacer el intervalo lineal del ensayo, por ejemplo, 200 µl de tampón se mezclaron con 200 µl de muestra (mezclado y ajuste de temperatura a 37 °C) y 200 µl de solución de sustrato cromogénico. Se midió la cinética de absorción a 405 nm (1-3 minutos) a 37°C, mediante un espectrofotómetro. La



actividad proteolítica de la muestra se calcula a partir de la diferencia de absorción inicial ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) mediante la ecuación  $C \text{ (U/l)} = 313 \times \Delta\text{Abs}/\text{min} \times F$  ( $C$  = actividad proteolítica,  $F$  = factor de dilución)

**Tabla 5: Reducción de la actividad proteolítica mediante el tratamiento con ácido octanoico**

	<b>Tratamiento con ácido octanoico sin vibromezclado</b>	<b>Tratamiento con ácido octanoico con vibromezclado</b>
<b>Materiales de partida (U/l)</b>	5630	5630
<b>Actividad proteolítica residual promedio después del tratamiento con ácido octanoico/fosfato (U/l)</b>	42	< 8 (LOD)

5 Cuando se utilizó vibromezclado, el filtrado después del tratamiento con ácido octanoico fue límpido. En el experimento de comparación, el filtrado después del tratamiento con ácido octanoico y el agitador de palas era muy opaco y difícil de filtrar.

10 Ejemplo 7: Títulos antibacterianos en una preparación de IgM

15 Para su comparación con la única preparación comercialmente disponible que IgM tolerable para administración intravenosa, Pentaglobin, las actividades antibacterianas se analizaron en tres lotes de este fármaco bien caracterizado, y se comparó con la presente preparación. La determinación de los anticuerpos de la clase IgA o IgM en la preparación de IgM comparada con los antígenos antibacterianos o antifúngicos se llevó a cabo mediante ELISA. Placas de microtitulación se revistieron con el correspondiente antígeno y se incubaron con un patrón o la preparación de IgM. Los anticuerpos unidos al antígeno se detectaron con un conjugado de IgA dirigido contra IgG humana o un conjugado de IgM dirigido contra IgG humana. La detección se llevó a cabo usando un sustrato de enzima. El cambio de color resultante corresponde a la cantidad de anticuerpos presentes en la preparación de IgM.

20 **Tabla 6 Comparación de la actividad de unión antibacteriana de IgM en la presente preparación y en Pentaglobin comercialmente disponible**

<b>parámetro</b>	<b>unidad</b>	<b>IgM presente en el medio de preparación</b>	<b>Promedio en el producto comercial Pentaglobin</b>
Anticuerpos IgM contra <i>Pneumococcus saccharide</i>	U/mg IgM	72	21
Anticuerpos IgM contra <i>Escherichia coli</i>	IgM	62	39
Anticuerpos IgM contra <i>Enterococcus faecalis</i>	U/mg IgM	69	27
Anticuerpos IgM contra <i>Candida albicans</i>	U/mg IgM	61	41
Anticuerpos IgM contra <i>Chlamydia</i>	U/mg IgM	71	6

25 **Tabla 7 Comparación de la actividad de unión antibacteriana de IgA en la presente preparación y en Pentaglobin comercialmente disponible**

<b>parámetro</b>	<b>unidad</b>	<b>IgM presente en el medio de preparación</b>	<b>Promedio en el producto comercial Pentaglobin</b>
Anticuerpos IgA contra <i>Pneumococcus saccharide</i>	U/mg IgA	86	25
Anticuerpos IgA contra <i>Escherichia coli</i>	U/mg IgA	83	26
Anticuerpos IgA contra <i>Enterococcus faecalis</i>	U/mg IgA	93	21
Anticuerpos IgA contra <i>Chlamydia</i>	U/mg IgA	65	38
Anticuerpos IgA <i>Helicobacter pylori</i>	U/mg IgA	59	24

Las actividades mediadas por IgM e IgA en la nueva preparación fueron típicamente al menos 1,5 veces más que en Pentaglobin, lo que se puede explicar porque IgM e IgA de Pentaglobin están modificadas químicamente con  $\beta$ -propiolactona. Esta etapa es sustituye por los procedimientos más suaves del presente método.

- 5 En su conjunto, estos datos demostraron que la región de unión de las moléculas IgM en la preparación final está funcionalmente completamente activa.

Ejemplo 8 Estudios de estabilidad durante el almacenamiento con el producto IgM líquido

- 10 El producto de acuerdo con el Ejemplo 1 sin tratamiento con UVC se almacenó en viales de vidrio de 10 o 100 ml (volumen de llenado 5 ml o 50 ml) a 2 - 8°C y se analizaron todos los parámetros de la especificación. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los parámetros relevantes para mostrar la estabilidad son el contenido en fragmentos y agregados que se mide mediante cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HPSEC), la actividad proteolítica (AP) y la actividad anti-complementaria (ACA). Estos parámetros son fundamentales para la tolerabilidad intravenosa, y es probable que cambien durante el almacenamiento a largo plazo. A 2 - 8 °C no se produjeron cambios significativos en estos parámetros. Incluso durante el almacenamiento a temperatura ambiente (23 - 27°C), estos valores permanecieron dentro de la especificación, aunque se produjo un pequeño aumento de fragmentos después de 24 meses a temperatura ambiente. También se determinaron otros parámetros, como la coloración, opalescencia, valor del pH y permanecieron inalterados durante la totalidad del periodo de estudio. Los títulos de IgM e IgA frente a diferentes bacterias permanecieron estables durante 2 años a 2 - 8°C.

- 25 El producto de acuerdo con el ejemplo 1 con tratamiento con UVC se almacenó en viales de vidrio de 10 o 100 ml (volumen de llenado 5 ml o 50 ml) a 2 - 8°C y temperatura ambiente y se analizaron todos los parámetros de la especificación. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Es este estudio de estabilidad continuado, los datos a 12 meses actualmente disponibles muestran el mismo perfil de estabilidad que el producto sin tratamiento UVC, lo que permite extrapolar la estabilidad a 24 meses.

**Tabla 8 Estabilidad del lote A586067 ensayado a 2-8 °C en posición de reposo Tamaño de llenado: 5 ml**

Parámetros ensayados	Requisito (Tolerancia)	Almacenamiento en meses a 2 - 8 °C							23 - 27°C
		0	3	6	9	12	18	24	24
proteína (g/l)	45-55	50,3	51,4	50,3	50,4	50,5	49,6	50,8	49,8
HPSEC									
% agregados > 1200 kD	≤ 5	0,9	0,6	0,5	0,8	0,6	1,0	1,3	1,7
fragmentos < 100 kD	≤ 5	0,2	0,6	1,1	0,7	1,6	0,9	1,2	4,1
actividad proteolítica (U/l)	< 8	< 8	< 8	< 8	n.t.	< 8	n.t.	< 8	< 8
contenido en inmunoglobulina (%)	> 95%	96,7	99,0	100	n.t.	99,5	n.t.	98,4	97,5
Contenido en IgM	≥ 20%	21,6	22,1	22,1	n.t.	22,3	n.t.	20,9	20,5
actividad anticomplementaria (CH50/mg proteína)	≤ 1,0	0,48	0,56	0,48	0,66	0,70	0,64	0,54	0,38
n.t. = no ensayado									

30 **Tabla 9 Estabilidad del lote A586057 ensayado a 2-8 °C en posición de reposo Tamaño de llenado: 50 ml**

Parámetros ensayados	Requisito (Tolerancia)	Almacenamiento en meses a 2 - 8 °C							23 - 27°C
		0	3	6	9	12	18	24	24
proteína (g/l)	45-55	50,2	50,8	49,7	50,4	50,3	49,4	50,3	49,7
HPSEC									
% agregados > 1200 kD	≤ 5	0,9	0,5	0,4	0,8	0,6	1,0	1,3	1,5
fragmentos < 100 kD	≤ 5	0,3	0,6	1,0	0,9	1,4	1,2	1,2	4,2
actividad proteolítica (U/l)	< 8	< 8	< 8	< 8	n.t.	< 8	n.t.	< 8	< 8
contenido en inmunoglobulina (%)	> 95%	98,6	98,9	100	n.t.	99,5	n.t.	98,5	98,0
Contenido en IgM	≥ 20%	21,3	22,3	24,5	n.t.	22,0	n.t.	20,9	20,1
actividad anticomplementaria (CH50/mg proteína)	≤ 1,0	0,48	0,82	0,52	0,64	0,68	0,48	0,60	0,40

Ejemplo 9 Activación inespecífica del complemento in vitro en el producto IgM

## Ejemplo 9A -Determinación de los niveles de C5a

5 Se llevó a cabo un análisis del potencial de la preparación de IgM para activar in vitro el complemento de forma inespecífica usando el factor C5a como marcador de la activación de la ruta del complemento terminal. Con este fin, se incubó suero humano con los productos de inmunoglobulina o tampón durante 120 min. Las muestras se tomaron a 0, 5, 15, 60 y 120 minutos de incubación. Para demostrar el funcionamiento correcto del sistema in vitro, se demostró tanto la inhibición completa como la activación completa del sistema del complemento. La concentración del factor de complemento se midió mediante determinaciones de la densidad óptica usando un fotómetro con un kit de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) comercial (Quidel MicroVue C5a Plus EIA Kit; A025).

15 E suero humano (Quidel NHS; A113) se descongeló suavemente a 37°C e inmediatamente se puso sobre hielo. Cada muestra simple consistió en un lote de reacción que contenía suero (100 µl). En primer lugar se pipetearon los aditivos, seguido de la adición de suero humano para iniciar la reacción de cada lote de reacción.

20 El suero humano sin aditivos sirvió como blanco, y mostró una activación del complemento inicial debido a la configuración experimental. La adición de IgG térmicamente agregada (HAAG Quidel; A114; 1,3 µl) sirvió como activador intenso del complemento sérico humano para demostrar la sensibilidad del sistema in vitro. Se añadió EDTA (concentración final 10 mM) al suero humano para inhibir totalmente la activación del complemento durante la totalidad del tiempo de reacción, y el experimento se ajustó a una concentración de IgM de 1,72 mg/ml en cada reacción. Como controles negativos, se usaron los volúmenes respectivos del tampón de formulación.

25 Todas las reacciones se detuvieron tras incubación durante 0, 5, 15, 60 y 120 minutos a 37°C con agitación constante mediante la adición de solución de estabilización (estabilizador de muestras Quidel A9576; 140 µl). La posterior dilución de la muestra y análisis mediante ELISA se llevó a cabo según el protocolo del fabricante. El experimento se llevó a cabo en dos réplicas independientes, y se calculó el valor promedio. Los resultados se muestran en la Tabla 10 y en la Figura 2.

30 La adición del activador (IgG térmicamente agregada) llevó a un fuerte aumento de C5a en un plazo de 15 minutos, lo que indica una respuesta sensible del sistema *in vitro* para detectar la activación del complemento. La adición de EDTA como inhibidor dio como resultado valores inalterados para la totalidad del tiempo de incubación, lo que muestra que la activación del complemento es específica y no es un artefacto debido a la manipulación o la preparación de la muestra. La incubación del suero humano a 37°C y su exposición a superficies artificiales indujo una ligera activación del complemento, que se documentó como valor del blanco.

40 La preparación de la IgM de referencia de acuerdo con el documento EP0413187 dio como resultado la activación del complemento en más de 1000 ng/ml después de 60 minutos (Tabla 10). La preparación de referencia comercialmente disponibles químicamente modificada Pentaglobin (documento EP0013901) siguió mostrando la mitad del potencial de activación del complemento comparada con el producto del documento EP0413187.

45 La concentración de C5a en suero tratado con la preparación de IgM es comparable a la concentración de C5a medida en suero sin aditivos (blanco) o en suero tratado con los tampones de formulación (glicina 300 mM, pH 4,3 o NaCl al 0,45 %/glucosa al 2,5%, pH 6,8). De esta forma, las inmunoglobulinas de la preparación de IgM sustancialmente no activan el complemento de forma no específica en suero humano en el sistema de ensayo *in vitro*.

**Tabla 10 Concentración media de C5a detectada en suero humano tratado con inmunoglobulina que contienen IgM**

Tiempo [min]	0	5	15	60	120
C5a presente en la preparación de IgM [ng/ml]	23,8	42,0	110,5	162,0	150,8
C5a en Pentaglobin (documento EP0013901) [ng/ml]	46,4	55,4	329,2	460,9	653,5
C5a en el producto del documento EP0413187) [ng/ml]	21,1	149,5	423,2	1029,4	1084,2
<b>Controles</b>					
C5a en el blanco [ng/ml]	22,3	30,7	66,2	149,5	168,1
C5a en el activador (polímeros de IgG) [ng/ml]	19,4	897,6	3409,2	4536,1	4829,6
C5a en el inhibidor EDTA [ng/ml]	25,9	22,3	25,5	23,8	27,5
C5a en el tampón de formulación de IgM [ng/ml]	19,8	35,5	101,2	112,8	173,4
C5a en el tampón de formulación de Pentaglobin [ng/ml]	26,2	33,1	56,7	82,6	187,2

50

## Ejemplo 9B Determinación de los niveles de C3a

Se llevó a cabo un análisis del potencial de la preparación de IgM para activar *in vitro* el complemento de forma inespecífica usando el factor C3a como marcador de la activación de la ruta del complemento. Con este fin, se incubó suero humano con los productos de inmunoglobulina o tampón durante 120 min. Las muestras se tomaron a 0, 5, 15, 60 y 120 minutos de incubación. Para demostrar el funcionamiento correcto del sistema *in vitro*, se demostró tanto la inhibición completa como la activación completa del sistema del complemento. La concentración del factor de complemento se midió mediante determinaciones de la densidad óptica usando un fotómetro con un kit de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) comercial (Quidel MicroVue C3a Plus EIA Kit; A032).

El suero humano (Quidel NHS; A113) se descongeló suavemente a 37°C e inmediatamente se puso sobre hielo. Cada muestra simple consistió en un lote de reacción que contenía suero (100 µl). En primer lugar se pipetearon los aditivos, seguido de la adición de suero humano para iniciar la reacción de cada lote de reacción.

El suero humano sin aditivos sirvió como blanco, y mostró una activación del complemento inicial debido a la configuración experimental. La adición del factor de veneno de cobra (CVF Quidel; A600; 20 U/ml) sirvió como activador intenso del complemento sérico humano para demostrar la sensibilidad del sistema *in vitro*. Se añadió EDTA (concentración final 10 mM) al suero humano para inhibir totalmente la activación del complemento durante la totalidad del tiempo de reacción, y el tratamiento experimental. La preparación de IgM y de Pentaglobin (de acuerdo con el documento EP0013901) se ajustó a una concentración de IgM de 1,72 mg/ml en cada reacción. Como controles negativos, se usaron los volúmenes respectivos del tampón de formulación.

Todas las reacciones se detuvieron tras incubación durante 0, 5, 15, 60 y 120 minutos a 37°C con agitación constante mediante la adición de solución de estabilización (estabilizador de muestras Quidel A9576; 140 µl). La posterior dilución de la muestra y análisis mediante ELISA se llevó a cabo según el protocolo del fabricante. El experimento se llevó a cabo en dos réplicas independientes, y se calculó el valor promedio. Los resultados se muestran en la Tabla 11 y en la Figura 3.

La adición del activador (CVF) llevó a un fuerte aumento de C3a en un plazo de 15 minutos, lo que indica una respuesta sensible del sistema *in vitro* para detectar la activación del complemento. La adición de EDTA como inhibidor dio como resultado valores inalterados para la totalidad del tiempo de incubación, lo que muestra que la activación del complemento no es un artefacto debido a la manipulación o la preparación de la muestra. La incubación del suero humano a 37°C y su exposición a superficies artificiales indujo una ligera activación del complemento, que se documentó como valor del blanco. La preparación de referencia comercialmente disponibles químicamente modificada Pentaglobin (documento EP0013901) mostró un potencial de activador de C3 tres veces superior en comparación con el blanco.

La concentración de C3a en suero tratado con la preparación de IgM es comparable a la concentración de C3a medida en suero sin aditivos (blanco) o en suero tratado con los tampones de formulación (glicina 300 mM, pH 4,3 o NaCl al 0,45 %/glucosa al 2,5%, pH 6,8). De esta forma, las inmunoglobulinas de la preparación de IgM sustancialmente no activan el complemento de forma no específica en suero humano en el sistema de ensayo *in vitro* en cantidades notables.

**Tabla 11 Concentración media de C3a detectada en suero humano tratado con inmunoglobulina que contienen IgM**

Tiempo [min]	0	5	15	60	120
C3a presente en la preparación de IgM [ng/ml]	1458,3	2484,1	3972,1	5280,7	5703,1
C3a en Pentaglobin (documento EP0013901) [ng/ml]	1371,9	3069,4	7585,9	10225,4	11769,5
<b>Controles</b>					
C3a en el blanco [ng/ml]	1301,1	1742,6	2468,7	3361	4117,4
C3a en el activador (CVF) [ng/ml]	1194,3	6077,1	12796,8	27679,1	27284,5
C3a en el inhibidor EDTA [ng/ml]	1140,2	1098,0	1025,7	964,2	1004,8
C3a en el tampón de formulación de IgM [ng/ml]	1060,3	2262,3	2907,3	3480,7	4435,4
C3a en el tampón de formulación de Pentaglobin [ng/ml]	1070,9	1965,8	3548,0	4008,1	5251,9

Ejemplo 10 Experimentos in vivo en el producto IgM

Para confirmar la seguridad y la tolerabilidad, se estudiaron los efectos de la preparación de IgM sobre la tensión arterial tras infusiones intravenosas repetidas durante 5 días a 8 macacos conscientes. Se administró una dosis de 190 mg/IgM/kg/día de la preparación de IgM preparada de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Pentaglobin, la preparación que contiene IgM tolerable para administración intravenosa comercialmente disponible se administró a algunos monos como sustancia de comparación. Pentaglobin se administró de manera que se administrara la misma dosis de IgM. La tensión arterial se determinó después de la inyección para determinar si la administración estaba asociada con un nivel intolerable de activación del complemento no específica. Se administró una dosis de control de NaCl al 0,9% a los animales varias horas antes de la administración de las preparaciones de inmunoglobulina. La tensión arterial se determinó introduciendo un catéter de presión en la aorta abdominal inferior mediante la arteria femoral derecha. Los resultados se transmitieron por telemetría.

La administración de la preparación de IgM (15 ml/kg/día) solo tuvo efectos menores sobre la tensión arterial (promedio, sistólica y diastólica). Las diferencias hasta 4 horas después de cada infusión, en comparación con los valores anteriores al ensayo, no superior a 4 mm Hg. Estas diferencias se pueden considerar como no biológicamente relevantes.

**Tabla 12a Niveles de C3a [ng/ml] tras la administración de la preparación de IgM**

	C3a en el control (NaCl al 0,9%, pH 4,5) [ng/ml]	Administración de C3a en la preparación de IgM [ng/ml]
Promedio	229	240
SD	83	37
N	8	8

**Tabla 12b Niveles de C3a [ng/ml] tras la administración de la preparación de referencia Pentaglobin**

	C3a en el control (NaCl al 0,9%, pH 6,8) [ng/ml]	Administración de C3a en la preparación de IgM [ng/ml]
Promedio	204	263
SD	20	61
N	4	4

Los niveles de C3a se determinaron en muestras de plasma tomadas tras la inyección como marcador de la activación no específica de la ruta del complemento. Los niveles de C3a [ng/ml] solamente aumentaron ligeramente mediante la administración de la preparación de IgM (15 ml/kgPC) y fueron incluso inferiores a los obtenidos con la preparación de referencia Pentaglobin comercialmente disponible para cantidades iguales de IgM. La extracción de sangre se realizó aproximadamente 6 horas después del tratamiento.

No se pudieron atribuir hallazgos toxicológicos sustanciales a la preparación de IgM, y no se produjeron alteraciones relevantes que no se hubieran observado con Pentaglobin. Puesto que la seguridad de Pentaglobin está bien establecida en la práctica clínica durante muchos años, es razonable concluir que estas alteraciones no tienen ninguna relevancia clínica.

La buena tolerabilidad y seguridad de la preparación de IgM también se verificó en un estudio en Fase I con seres humanos en 24 voluntarios sanos, hombres y mujeres. La presión arterial sistólica en las primeras 4 horas tras la administración produjo una disminución promedio de solo aproximadamente un 9 % (11,9 mmHg) tras la infusión de 91 a 274 mg de la preparación de IgM por kg PC/d a 0,5 ml/min.

Este intervalo es análogo a la solución de placebo de NaCl al 0,9 % (9,4%, 11,7 mmHg).

No se registraron eventos adversos graves, y todos los eventos adversos no graves quedaron autolimitados. Además, no se produjo evidencia de la transmisión de un agente infeccioso, tal como se muestra mediante las determinaciones de PCT.

Se anota que la utilidad de los estudios de eficacia en modelos animales de las enfermedades relevantes es limitada debido a la inmunogenia y a los anticuerpos Gal preformados en las preparaciones de IgM obtenidas de plasma humano. Sin embargo, dado el conocimiento de la técnica anterior con respecto a uso de Pentaglobin en el tratamiento de patologías y los títulos de anticuerpos antibacterianos de la preparación de IgM preparada mediante el presente método (como se demostró en el Ejemplo 7) se puede concluir que la preparación de IgM tiene eficacia clínica.

Ejemplo 11 Integridad funcional de la parte Fc de la preparación de anticuerpo

- 5 La integridad funcional de la parte Fc de los anticuerpos en la preparación de anticuerpo preparada de acuerdo con el método descrito en el presente documento se analizó usando el método actual de la Eur. Ph. (2.7.9 Ensayo de la función Fc de inmunoglobulinas, edición actual de la Eur. Ph., abril de 2011) de acuerdo con las directrices europeas ICH S6 (CPMP/ICH/302/95) (Nota a la evaluación de la seguridad preclínica de productos obtenidos por biotecnología) para las preparaciones de IgG. La monografía de la European Pharmacopoeia para inmunoglobulinas (01/2005:20709) propone un ensayo basado en el antígeno de la rubeola para someter a ensayo la función Fc de las inmunoglobulinas.
- 10 En particular, glóbulos rojos humanos del grupo 0 descongelados se cargaron con el antígeno del virus de la rubeola. Volúmenes específicos de las preparaciones de anticuerpo se incubaron con glóbulos rojos revestidos de antígeno. La lisis iniciada por el complemento de los glóbulos rojos se inició mediante la adición del complemento de cobaya. La cinética de la hemólisis posterior se midió por variaciones de la absorbancia a 541 nm dependientes del tiempo. La evaluación se llevó a cabo usando la variación máxima de absorbancia por unidad de tiempo. La preparación de referencia de inmunoglobulina humana biológica; BRP con número de lote 3 se usó como comparador.
- 15
- 20 La actividad de la parte Fc de la molécula de anticuerpo se determinó en 7 lotes de la preparación que contenía el anticuerpo IgM que en todos los lotes estuvo comprendida entre 96,5 y 103,3 % comparada con la preparación biológica de referencia (BRP), demostrando de esta forma la funcionalidad de la preparación de anticuerpo que contenía IgM.

## REIVINDICACIONES

1. Una preparación de anticuerpos adecuada para su administración intravenosa a seres humanos que comprende anticuerpos IgG, IgA y al menos un 5% de anticuerpos IgM en peso de la cantidad total de anticuerpos, donde la preparación se prepara a partir de plasma humano, donde la preparación de anticuerpos tiene una actividad activadora específica del complemento, donde la preparación de anticuerpos se prepara mediante un proceso que puede eliminar más de  $3\log_{10}$  de virus sin envoltura y donde en un ensayo in vitro con suero humano adecuado para determinar la capacidad de la preparación de anticuerpos para activar el complemento inespecíficamente, la preparación de anticuerpos genera: (i) sustancialmente nada de C5a, de tal manera que la preparación de anticuerpos ajustada a una concentración de 1,72 mg/ml genera menos de 200 ng/ml de C5a después de 60 minutos del ensayo; y/o (ii) sustancialmente nada de C3a, de tal manera que la preparación de anticuerpos ajustada a una concentración de IgM de 1,72 mg/ml genera menos de 6000 ng/ml de C3a después de 60 minutos del ensayo.
2. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además más de un 5% de IgA y más de un 40% de IgG en peso de la cantidad total de anticuerpos.
3. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 que comprende al menos un 10% de IgM en peso de la cantidad total de anticuerpos, y que preferiblemente comprende al menos un 15% de IgM en peso de la cantidad total de los anticuerpos.
4. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde en el ensayo de suero in vitro, la preparación de anticuerpos con suero humano genera la misma cantidad de C5a y/o C3a que el suero humano solo  $\pm 70\%$ .
5. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde el ensayo de suero in vitro para determinar que la preparación de anticuerpos no genera sustancialmente C5a comprende las etapas de:
- (a) añadir una cantidad de la preparación de anticuerpos a 100  $\mu$ l de suero humano para crear una mezcla de reacción que contiene 1,72 mg/ml de IgM e incubar la mezcla de reacción durante 60 minutos a 37°C con agitación constante;
  - (b) preparar una serie de diluciones de la mezcla de reacción adecuada para un ELISA;
  - (c) llevar a cabo un ELISA de tipo sándwich en la serie de diluciones de la mezcla de reacción utilizando un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario dirigido contra C5a y una sustancia cromógena, donde el anticuerpo secundario se conjuga con una enzima y la sustancia cromógena es el sustrato de la enzima; y
  - (d) determinar la cantidad de C5a en la mezcla de reacción basándose en el cambio de color obtenido como resultado de poner en contacto la sustancia cromógena con la enzima unida a C5a mediante el anticuerpo secundario.
6. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde el ensayo de suero in vitro para determinar que la preparación de anticuerpos no genera sustancialmente C3a comprende las etapas de:
- (a) añadir una cantidad de la preparación de anticuerpos a 100  $\mu$ l de suero humano para crear una mezcla de reacción que contiene 1,72 mg/ml de IgM e incubar la mezcla de reacción durante 60 minutos a 37°C con agitación constante;
  - (b) preparar una serie de diluciones de la mezcla de reacción adecuada para un ELISA;
  - (c) llevar a cabo un ELISA de tipo sándwich en la serie de diluciones de la mezcla de reacción utilizando un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario dirigido contra C3a y una sustancia cromógena, donde el anticuerpo secundario se conjuga con una enzima y la sustancia cromógena es el sustrato de la enzima; y
  - (d) determinar la cantidad de C3a en la mezcla de reacción basándose en el cambio de color obtenido como resultado de poner en contacto la sustancia cromógena con la enzima unida a C3a mediante el anticuerpo secundario.
7. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende menos de un 2% de agregado de 1200 kDa o superior, y que preferentemente comprende menos del 1,5% de agregados de 1200 kDa o superior.
8. Una preparación de anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde la actividad anti-complementaria de la preparación es inferior a 1,0 CH50/mg proteína, y preferentemente donde la actividad anti-complementaria es inferior a 0,75 CH50/mg proteína.
9. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde:
- (i) la preparación de anticuerpos comprende un contenido en inmunoglobulinas superior al 95% del contenido total en proteína; y/o
  - (ii) la preparación de anticuerpo se prepara a partir de suero humano en ausencia de una etapa de tratamiento térmico a una temperatura de 40°C, o superior durante más de 10 minutos; y/o

(iii) la preparación de anticuerpos se prepara a partir de suero humano en ausencia de una etapa que implica la modificación química o enzimática de los anticuerpos, y preferentemente la preparación de anticuerpos se prepara en ausencia de una etapa de modificación química que es una etapa de puesta en contacto de los anticuerpos con  $\beta$ -propiolactona.

5 10. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con cualquier reivindicación anterior preparada a partir de plasma humano mediante un proceso que comprende las etapas de:

- 10 (a) preparar a partir del plasma humano un fracción de plasma en forma de solución que contiene inmunoglobulinas;
- (b) mezclar un ácido carboxílico C7 a C9 con la solución y tratar la solución mezclada con un agitador vibrador para precipitar las proteínas contaminantes;
- (c) separar las proteínas precipitadas a partir de la solución para dar como resultado la composición de inmunoglobulina que contiene la IgM;
- 15 (d) incubar la IgM que contiene la composición de inmunoglobulina a entre pH 3,5 y pH 4,5 para formar una solución incubada;
- (e) irradiar la solución incubada con UVC para formar una solución irradiada con UVC; y (f) filtrar la solución irradiada con UVC en condiciones estériles para formar la preparación de anticuerpos adecuada para su administración intravenosa a seres humanos.
- 20

11. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 10 donde el proceso comprende además someter la solución incubada obtenida de la etapa (d) a nanofiltración antes de la irradiación de la etapa (e).

12. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con cualquier reivindicación anterior donde:

- 25 (i) la preparación de anticuerpos se puede administrar a macacos a 115 mg IgM/kg de peso corporal/hora en ausencia de un 10% o más de reducción en la tensión arterial del nivel anterior al tratamiento; y/o
- (ii) al menos un 90% de los anticuerpos en la preparación de anticuerpos son biológicamente activos; y/o
- 30 (iii) en un ensayo in vitro basado en el antígeno de la rubeola adecuado para determinar la función de Fc, la actividad de la parte Fc de los anticuerpos de la preparación de anticuerpos es la misma que la de una preparación biológica de referencia  $\pm$  10%.

13. Una preparación de anticuerpos que comprende al menos un 15% de IgM, más de un 5% de IgA y más de un 40% de IgG en porcentaje de la cantidad total de anticuerpos, y que comprende menos de un 1,5% de agregados de 1200 kDa o mayores del contenido total de inmunoglobulina que se ha determinado mediante la cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento.

35

14. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 13, que está sustancialmente exenta de virus sin envoltura, que tiene una actividad anti-complementaria inferior a 0,75 CH50/mg proteína, y donde al menos un 90% de los anticuerpos en la preparación de anticuerpos son biológicamente activos, tal como se determina mediante la Eur. Ph. 2.7.9. Ensayo de la función Fc de las inmunoglobulinas.

40

15. Un método para producir una preparación de anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior a partir de plasma humano que comprende las etapas de:

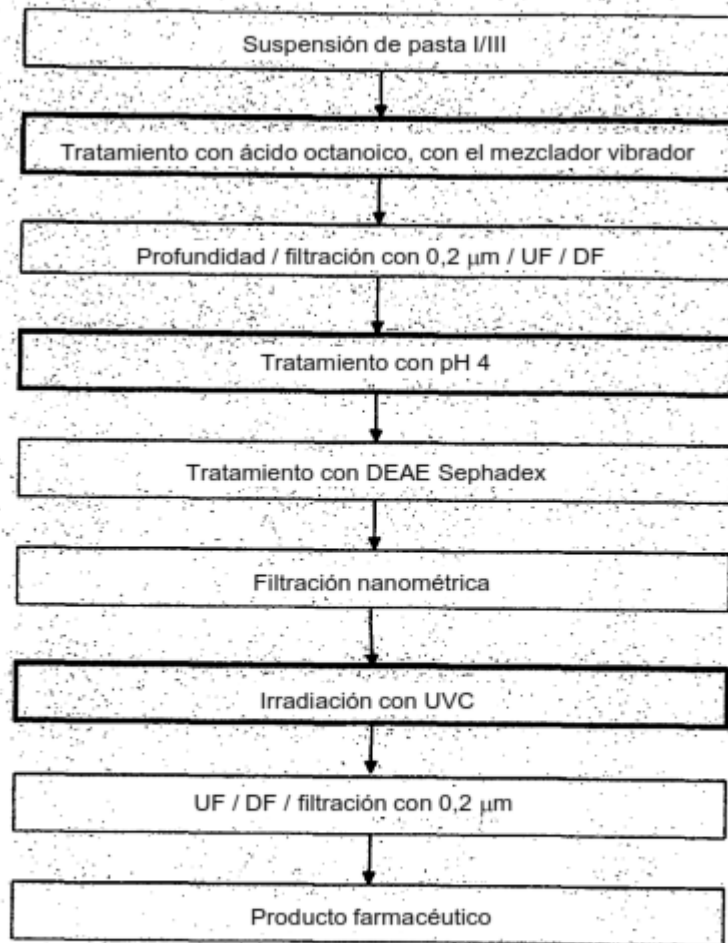
- 45 (a) preparar a partir del plasma humano un fracción de plasma en forma de solución que contiene inmunoglobulinas;
- (b) mezclar un ácido carboxílico C<sub>7</sub> a C<sub>9</sub> con la solución y tratar la solución mezclada con un agitador vibrador para precipitar las proteínas contaminantes;
- 50 (c) separar las proteínas precipitadas a partir de la solución para dar como resultado la composición de inmunoglobulina que contiene la IgM;
- (d) incubar la IgM que contiene la composición de inmunoglobulina a entre pH 3,5 y pH 4,5 para formar una solución incubada;
- (e) irradiar la solución incubada con UVC para formar una solución irradiada con UVC; y
- 55 (f) filtrar la UVC en condiciones estériles para formar la preparación de anticuerpos adecuada para su administración intravenosa a seres humanos.

16. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en medicina.

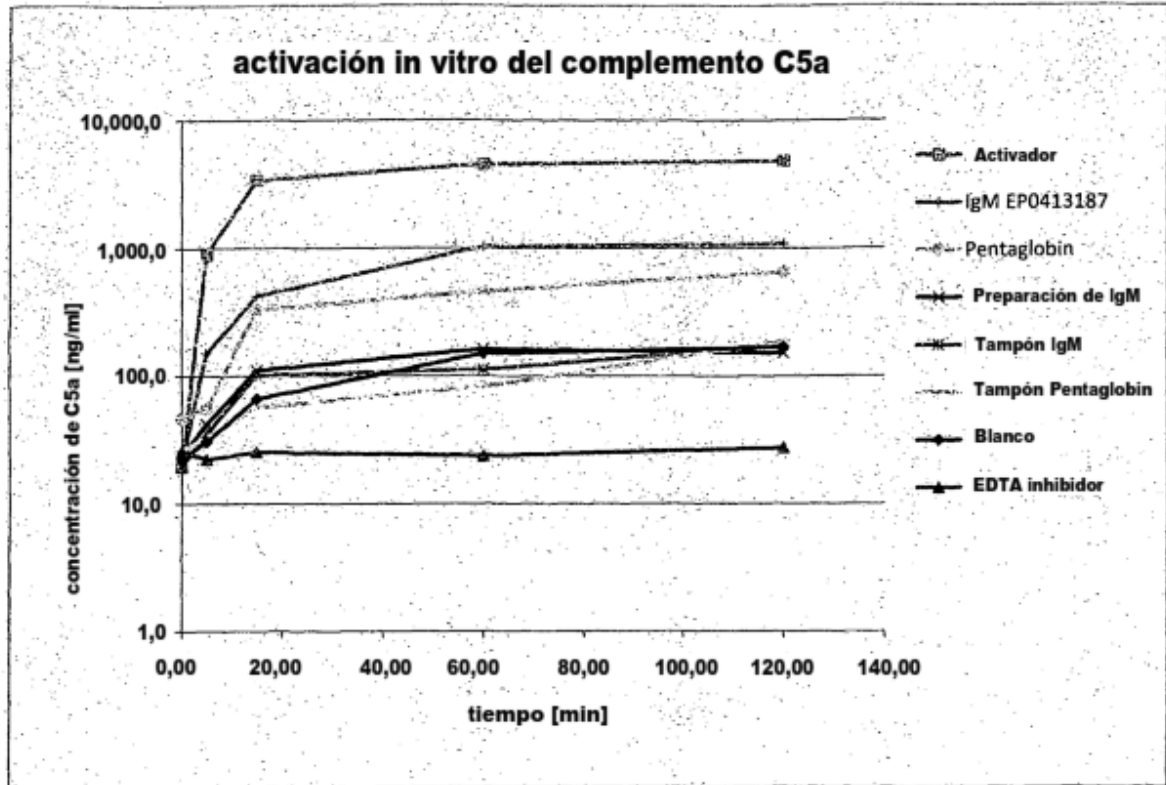
60

17. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 16 para su uso en el tratamiento de trastornos inmunes o de una infección bacteriana, preferentemente donde el trastorno inmune es un trastorno por deficiencia en IgM.

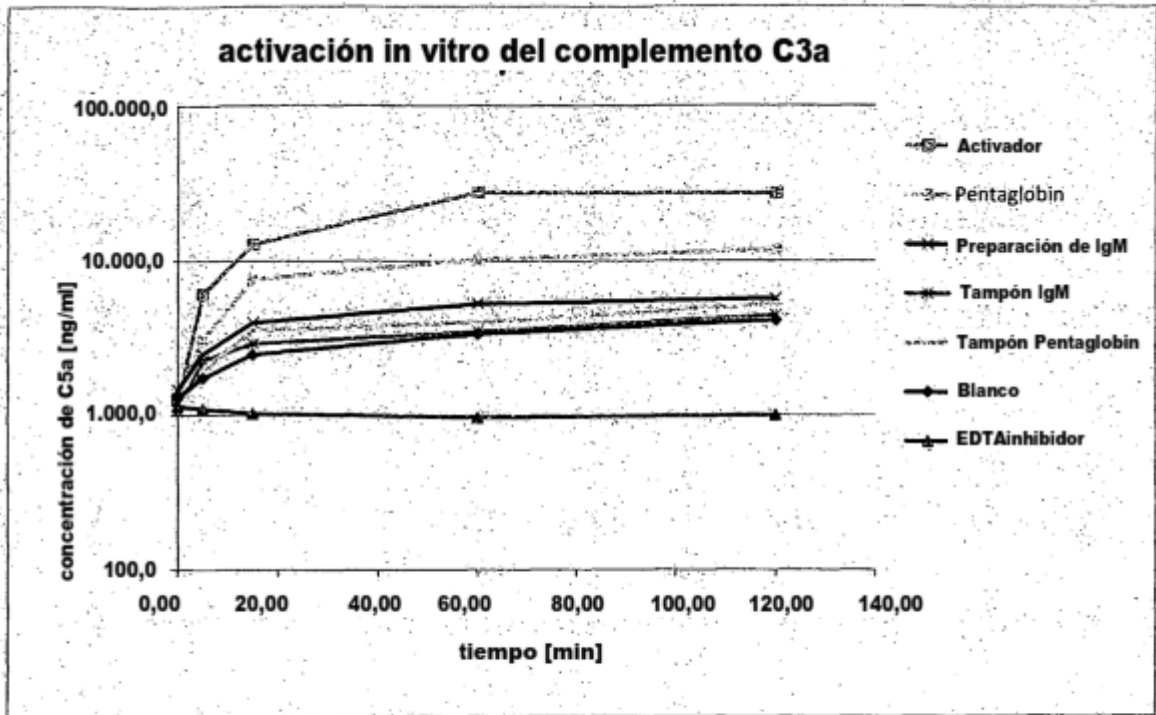




**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**