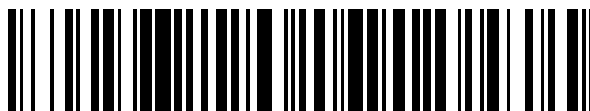


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 181**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/18** (2007.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2011 PCT/FR2011/051358**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11157950**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2011 E 11735499 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2582394**

54 Título: **Composición de inmunoglobulinas humanas estabilizada**

30 Prioridad:

**15.06.2010 FR 1054721**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.05.2020**

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANCAIS DU  
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES  
(100.0%)  
3, avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf  
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**HUILLE, SYLVAIN y  
COHEN-TANNOUDI, LAETITIA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 762 181 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

Composición de inmunoglobulinas humanas estabilizada

5 La invención se refiere a la formación de inmunoglobulinas G humanas, útiles en terapia.

10 Actualmente se tratan numerosas patologías con composiciones de inmunoglobulinas G (IgG). Se pueden citar, por ejemplo, las deficiencias inmunitarias primarias con defecto de producción de anticuerpos, la enfermedad de Kawasaki, la púrpura trombopénica inmunológica del niño y del adulto, las deficiencias inmunitarias secundarias con defecto de producción de anticuerpos, en particular la leucemia linfocítica crónica o mieloma asociada a infecciones de repetición, la infección del niño por VIH asociada a infecciones bacterianas, las neuropatías motoras multifocales, el síndrome de Guillain-Barré, las infecciones agudas severas o crónicas de Parvovirus B19, la inmunodeficiencia adquirida o constitucional, la dermatomiositis cortico-resistente, la miastenia aguda, la poliradiculoneuritis crónica idiopática, la púrpura trombopénica inmunológica, por ejemplo asociada a la infección por VIH, el síndrome del hombre rígido (Stiffman síndrome), la neutropenia autoinmune, la eritroblastopenia autoinmune resistente, el síndrome de anticoagulación adquirido por autoanticuerpos, la poliartritis reumatoide, etc.

20 Durante estos últimos años, la muy alta demanda de IgG ha generado situaciones de tensión extremas sobre los aprovisionamientos, que puede ir hasta situaciones de escasez en Europa y en los Estados Unidos de América.

25 En este contexto, existe una necesidad en aumento de producir unas composiciones de IgG, inyectables por vía intravenosa, a partir, por ejemplo, de plasmas humanos. Con el auge de estas necesidades en IgG, la estabilización de estas composiciones de IgG inyectables por vía intravenosa (IgGIV) para su utilización terapéutica y su conservación reviste de un carácter fundamental.

30 Para eso, se sabe que es necesario estabilizar las IgGIV para evitar especialmente la formación de agregados (oligómeros y polímeros) susceptibles de activar el sistema del complemento con riesgos asociados de reacciones anafilácticas, cefaleas, fiebres, rojeces, bajada de tensión (Bolli *et al.*, Biologicals, 2010, 38: 150-157). Por otro lado, la presencia de dímeros en las IgGIV se ha correlacionado con bajadas de presión arterial *in vivo*. También pueden intervenir otras degradaciones físicoquímicas durante la conservación de las IgG como, entre otros, la oxidación y la hidrólisis.

35 La estabilización de las IgG necesita por lo tanto la adición de compuestos, clásicamente seleccionados entre los azúcares y los aminoácidos, a fin de obtener, no solamente composiciones de IgG no degradadas apropiadas para un uso terapéutico, sino también unas composiciones de IgG que presenten una estabilidad incrementada durante el almacenamiento.

40 Se han propuesto varias formulaciones de inmunoglobulinas humanas destinadas a una administración intravenosa (véase especialmente la patente US 5,945,098, las solicitudes de patente WO2005/049078 o WO96/07429). Una formulación particularmente eficaz para estabilizar las composiciones de inmunoglobulinas se describe en la solicitud de patente internacional WO 2004/091656 depositada por la solicitante. Esta solicitud de patente divulga una composición que contiene 50 g/l de IgG, 50 g/l de manitol, 10 g/l de glicina y 50 ppm de detergente, correspondiendo 50 ppm de detergente a una concentración de 50 mg/l de detergente.

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

50 Composiciones líquidas de IgGIV que contienen como estabilizantes maltosa al 10%, glicina de 0,16 a 0,24 M y D-sorbitol al 5% se conocen respectivamente bajo los nombres de marca Octagam™, (Octapharma), Gamunex™ 10% (Talecris) y Venoglobulin™ (Alpha).

55 Sin embargo, existe todavía una necesidad de formulaciones de IgGIV que sean bien toleradas y que sean suficientemente estables para una conservación óptima, facilitando su uso.

Resumen de la invención:

60 La solicitante ha realizado ahora una composición farmacéutica que comprende inmunoglobulinas G humanas formuladas con glicina y un detergente no iónico, a un pH inferior o igual a 4,8.

Los inventores han mostrado más particularmente la importancia de un bajo pH para estabilizar esta formulación.

65 Un objeto de la invención es, por lo tanto, una composición farmacéutica que comprende unas inmunoglobulinas G humanas (IgG), conforme a la reivindicación 1.

La composición presenta un pH comprendido entre 4,4 y 4,8. Preferentemente, el pH es de 4,6.

La composición según la invención es ventajosamente en forma líquida. Puede prepararse directamente u obtenerse por reconstitución con agua a partir de liofilizado.

- 5 Otro objeto de la invención es una composición sólida obtenida por desecación, preferentemente liofilización, de una composición líquida tal como se ha definido aquí.

Descripción detallada:

10 Definiciones

Se entiende por "inmunoglobulinas G humanas" o "IgG humanas" en el ámbito de la invención, unas inmunoglobulinas polivalentes que son esencialmente unas IgG que incluyen eventualmente unas IgM. Puede tratarse de inmunoglobulinas enteras, o de fragmentos tales como F(ab')<sub>2</sub> o F(ab) y cualquier fracción intermedia obtenida durante el procedimiento de fabricación de las inmunoglobulinas polivalentes.

15

El término "estabilidad" corresponde a la estabilidad física y/o química de las IgG.

20 El término "estabilidad física" se refiere a la reducción o la ausencia de formación de agregados insolubles o solubles de las formas diméricas, oligoméricas o poliméricas de las Ig, así como a la reducción o la ausencia de cualquier desnaturalización estructural de la molécula.

25 El término "estabilidad química" se refiere a la reducción o la ausencia de cualquier modificación química de las IgG durante el almacenamiento, en estado sólido o en forma disuelta, en condiciones aceleradas. Por ejemplo, se evitan o se retrasan los fenómenos de hidrólisis, desaminación, y/u oxidación. Se limita la oxidación de los aminoácidos que contienen azufre.

Formulaciones:

30 La concentración en IgG es de 100 g/l.

Las concentraciones se determinan frente a composiciones en forma líquida, antes de la desecación, o después de la reconstrucción en forma de preparación inyectable.

35 La composición no contiene manitol. En efecto, se ha demostrado que el manitol no era esencial para la estabilización de la formulación.

Más particularmente, en un modo de realización preferido, los únicos excipientes son la glicina y el detergente no iónico.

40 El detergente no iónico utilizado en la composición según la invención es el polisorbato 80 (o Tween'80 que es un monooleato de polioxietilensorbitano).

45 Las composiciones de la invención pueden también comprender otros aditivos. Tal aditivo puede también representar un compuesto seleccionado entre las diferentes categorías de estabilizantes clásicamente utilizados en el campo técnico de la invención, tales como los tensioactivos, los azúcares y los aminoácidos, como un excipiente añadido a la formulación a fin de ajustar, por ejemplo, el pH, la fuerza iónica, etc. Alternativamente, la composición según la invención no comprende otros excipientes que dicha glicina y detergente no iónico. Tal composición presenta la ventaja de ofrecer una buena estabilización de las composiciones de inmunoglobulinas y una reducción de las duraciones y de los costes de preparación a escala industrial gracias a la presencia de un número mínimo eficaz de excipientes, así como a la presencia de una cantidad mínima eficaz de excipientes.

La composición según la invención comprende:

55 - 100 g/l de IgG

- 250 mM de glicina

60 - 50 mg/l de polisorbato 80.

Las inmunoglobulinas G se obtienen generalmente por fraccionamiento del plasma sanguíneo humano, y se presentan en un medio acuoso. El medio acuoso está compuesto de agua para preparación inyectable (agua PPI) que puede contener unos excipientes farmacéuticamente aceptables y compatibles con las IgG. Las composiciones de IgG pueden, previamente, sufrir unas etapas específicas de inactivación/eliminación de virus, tal como un tratamiento disolvente detergente, una pasteurización y/o una nanofiltración. La composición según la invención comprende unas IgG que pueden ser policlonales o monoclonales. Las IgG pueden aislarse a partir de la sangre humana o animal o

65

producirse por otros medios, por ejemplo mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo en sistemas celulares bien conocidos por el experto en la materia. La composición según la invención es particularmente adecuada para las IgG altamente purificadas. Ventajosamente, las IgG de la presente invención se obtienen por fraccionamiento del plasma humano. Unos métodos de fraccionamiento preferidos del plasma humano se describen por Cohn *et al.* (J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946), Kistler *et al.* (Vox Sang., 7, 1962, 414-424), Steinbuch *et al.* (Rev. Franç. Et. Clin. y Biol., XIV, 1054, 1969) y en la solicitud de patente WO 94/9334. Un método de preparación de una composición de inmunoglobulinas G se describe también en la solicitud de patente WO 02/092632.

Las composiciones líquidas según la invención pueden pasar por una desecación para obtener una forma sólida que se conserva más tiempo y es más práctica para el transporte y la comercialización. La desecación es un procedimiento de eliminación del agua en una etapa avanzada. Se trata de una deshidratación que tiene como objetivo eliminar tanta agua como sea posible. Este fenómeno puede ser natural o forzado. Esta desecación se puede realizar con la ayuda de las técnicas de liofilización, de atomización y de criatomización. El modo preferido de obtención de la forma sólida de la composición para uso farmacéutico según la invención es la liofilización. Los métodos de liofilización son bien conocidos por el experto en la materia, véase por ejemplo [Wang *et al.*, Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, International Journal of Pharmaceutics, Vol 203, p 1-60, 2000]. Se puede considerar otros procedimientos apropiados para reducir el grado de humedad o el contenido de agua de la composición. Preferentemente, el grado de humedad es inferior o igual al 3% en peso, preferentemente inferior o igual al 2,5%, preferentemente inferior o igual al 2%, preferentemente inferior o igual al 1,5%.

La composición según la invención se puede someter ventajosamente a un método de eliminación o de inactivación de los agentes infecciosos, por ejemplo por calentamiento en seco del liofilizado.

La composición sólida según la invención, preferentemente en forma liofilizada, se puede disolver en agua para preparaciones inyectables (o "water for injection o WFI"), para obtener una formulación para uso terapéutico.

Vías de administración:

La composición de la invención es útil en terapia, y especialmente en forma inyectable, preferentemente por vía intravenosa. La composición está entonces en forma líquida.

#### Leyendas de las figuras

Las figuras 1A y 1B representan unos histogramas que muestran las mediciones de difusión de la luz en modo dinámico (figura 1A) o en modo estático (figura 1B), sobre formulaciones de inmunoglobulinas en glicina, a diversos valores de pH.

La figura 2 es un gráfico que ilustra los resultados de un seguimiento de medición de la turbidez (DO a 400 nm) de formulaciones de inmunoglobulinas a diversos pH, en condiciones de estrés térmico (57°C).

La figura 3 es un gráfico que ilustra la influencia del pH sobre la turbidez de formulaciones de inmunoglobulinas, en condiciones de estrés de agitación rotativo (inversión de los frascos).

#### **Ejemplos:**

##### **Ejemplo 1: Estudio de la influencia del pH sobre el comportamiento de las inmunoglobulinas**

Se ha ensayado la influencia del pH sobre unas formulaciones de inmunoglobulinas G humanas concentradas al 10% en un tampón glicina 100 mM, ajustándose el pH en condiciones no desnaturizantes, es decir por diálisis contra un tampón ajustado en pH que permite alcanzar el pH objetivo. Se ensayan varios pH: 4,6; 5,2; 5,7; 6,4; 6,8.

El estado de agregación de las inmunoglobulinas se sigue mediante un ensayo de difusión de la luz (ángulo de 90°) después del ajuste del pH (t=0). Después del ajuste, y sin aplicar estrés sobre las formulaciones, las soluciones presentan unos estados de agregación diferentes.

En efecto, las mediciones de difusión de la luz en modo estático y en modo dinámico muestran un aumento de la agregación submicrónica con el aumento del pH (figuras 1A y 1B).

La solución proteica está compuesta de diferentes subclases de inmunoglobulinas (Ig1, Ig2, Ig3 e Ig4) que presentan una heterogeneidad para su punto isoeléctrico (pI), que va de 5 a 9 aproximadamente. El pH jugaría en realidad directamente sobre la carga efectiva de las inmunoglobulinas (Ig), para las que tienen un pI bajo (<7,0). En esta zona de pH, algunas Ig pasan de una carga globalmente positiva a una carga globalmente negativa, lo que cambia la naturaleza de las interacciones electrostáticas con las otras Ig. La agregación observada aquí después del ajuste del pH se parece a la oligomerización.

Los ensayos muestran que para obtener unas interacciones globalmente repulsivas, y por lo tanto estabilizantes, un

pH de aproximadamente 4,6 es favorable.

La figura 2 ilustra los resultados de un seguimiento de medición de la turbidez (DO a 400 nm) en condiciones de estrés térmico (57°C) mostrando la influencia del pH sobre la agregación macroscópica de las Ig. De nuevo, el pH de 4,6 es el más favorable, favoreciendo la elevación del pH los fenómenos de agregación.

Se lleva también a cabo un estrés de agitación rotativo (inversión de los frascos) para justificar la función del pH sobre la agregación a las interfaces agua-aire. Se realizan mediciones de turbidez después de la centrifugación y de la resuspensión para eliminar las microburbujas eventuales. La figura 3 muestra que la agregación de las Ig a las interfaces está fuertemente influenciada por el pH.

**Ejemplo 2: Formulaciones de inmunoglobulinas**

Se prepararon varias formulaciones de inmunoglobulinas humanas a una concentración del 10%, con los excipientes siguientes, a pH 4,6:

Tabla 1: Formulaciones ensayadas

IgNG	Glicina (93mM) - Manitol (175mM- 32 g/l) - Tween 80 50ppm
GL	Glicina (200mM) - Leucina (50mM)
GT20	Glicina (250mM) - Tween 20 20ppm
GLT20	Glicina (200mM) - Leucina (50mM)-Tween 20 5ppm
GLM	Glicina (100mM) - Leucina (50mM)-Manitol (100mM-18 g/l)
GMT20	Glicina (150mM) - Manitol (100mM- 18 g/l) - Tween 20 20ppm
GT80	Glicina (250mM) - Tween 80 50ppm

Las inmunoglobulinas utilizadas provienen de una solución concentrada a 168 g/l a pH=4,7, sin ningún excipiente de formulación, obteniéndose esta solución a partir de un fraccionamiento de plasma humano, y después ultrafiltración tangencial. Las formulaciones GT80 y GT20 se han preparado por dilución de las Ig en unos tampones de formulación para alcanzar un título proteico de 100 g/l, y las concentraciones objetivas en excipientes. Se ha utilizado el ácido clorhídrico para ajustar el pH.

Las formulaciones se sometieron a unos ensayos de estabilidad denominada “acelerada”, conservándolas a 25°C o a 40°C, durante 6, 13 o 19 semanas.

La degradación física se ha seguido mediante análisis de los fenómenos de agregación por HPSEC para el seguimiento de los dímeros/oligómeros y polímeros, la DLS (por “dinamic light scattering” medida de la difusión de la luz) para la agregación submicrónica, el recuento de partículas sub-visibles (tamaño entre 10 y 50 µm), y observación visual (tamaño > 50 µm).

La estabilidad química se ha seguido por HPSEC y SDS-PAGE para seguir la fragmentación, y el análisis de los anti-HBs (anticuerpos antiantígenos de superficie de la hepatitis B) ha proporcionado un indicador de la estabilidad de la función Fab.

La actividad anticomplementaria (AAC) se ha determinado mediante la medición de la captación específica del complemento por las Ig. Este ensayo describe la capacidad de las inmunoglobulinas para activar el sistema del complemento, pudiendo una activación demasiado alta del complemento perjudicar a la tolerancia del producto durante su inyección.

Las formulaciones IgNG,GT80 y GT20 han dado globalmente los mejores resultados.

El tensioactivo (Tween) ha favorecido la estabilidad física de las formulaciones.

De manera sorprendente, la presencia de manitol no resultó ser esencial, presentando las formulaciones GT80 y GT20 (desprovistas de manitol) unas estabilidades al menos tan buenas como la formulación IgNG (con manitol).

Las formulaciones siguientes se reconocen, por lo tanto, como las más ventajosas:

- Formulación GT80: Glicina 250mM, Tween® 80 50ppm, pH =4,6

- Formulación GT20: Glicina 250mM, Tween® 20 20ppm, pH=4,6

**Ejemplo 3: Estabilidad de la formulación GT80 (pH=4,6)**

La estabilidad de la formulación GT80 se compara con la de una formulación IgNG, durante 12 meses a 25°C y a 40°C.

Tabla 2: Formulaciones GT80 e IgNG (10% de inmunoglobulinas humanas IgIV)

IgNG	Glicina (93mM) - Manitol (175mM- 32g/l) - Tween 80 50ppm
GT80	Glicina (250mM) - Tween 80 50ppm

A T0, los frascos se colocan en cámaras termostatzadas 25º y 40ºC, y su estabilidad según el protocolo de estabilidad acelerada se sigue según el programa siguiente:

Tabla 3: Programa de la estabilidad acelerada

	T0	T6S	T13S	T19S	T6,5M	T9M	T12M
25°C		√	√	√	√	√	√
40°C	√	√	√	√*			√*

\* análisis más discriminantes únicamente

Después de 12 meses a 25°C y 40°C, las formulaciones GT80 e IgNG presentan una estabilidad comparable:

- las formulaciones puestas en estabilidad tienen unos comportamientos idénticos desde el punto de vista de la degradación química: la fragmentación se observa a 40°C por HPSEC y SDS-PAGE y una pérdida de la actividad Fab a 40°C;

- las formulaciones son idénticas en lo que se refiere a la agregación submicrónica observada a 40°C en DLS y en HPSEC;

- una agregación macroscópica se observa a 40°C, así como la aparición de una coloración amarilla. Esta coloración es idéntica para las formulaciones GT80 e IgNG. A 25°C, las 2 formulaciones son incoloras.

- las diferencias observadas en AAC siguen siendo bajas. Las dos formulaciones evolucionan de manera comparable a 25°C y 40°C. El manitol no contribuye a la estabilidad de IgNG frente al ensayo AAC.

Estos resultados de estabilidad a 12 meses confirman que la adición de manitol no tiene efecto sobre la estabilidad de IgNG.

En definitiva, la formulación GT80 constituida de glicina (250 mM) y de Tween 80 (50 ppm) es una formulación estable adecuada para una utilización terapéutica comercial. Después de 12 meses a 25°C, todos los análisis realizados son conformes según la farmacopea europea.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición farmacéutica líquida que comprende 100 g/l de inmunoglobulina G humanas (IgG), 250 mM de glicina, y 50 mg/l de polisorbato 80, presentando dicha composición un pH comprendido entre 4,4 y 4,8, y que no contiene manitol.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, presentando dicha composición un pH de 4,6.
- 10 3. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada por que los únicos excipientes son la glicina y el detergente no iónico.
4. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que las inmunoglobulinas G se obtienen por fraccionamiento del plasma sanguíneo humano.
- 15 5. Composición según una de las reivindicaciones 1 a 4, que se obtiene por reconstitución con agua, a partir de un liofilizado.
- 20 6. Composición sólida obtenida por desecación, preferentemente liofilización, de una composición líquida según una de las reivindicaciones 1 a 5.

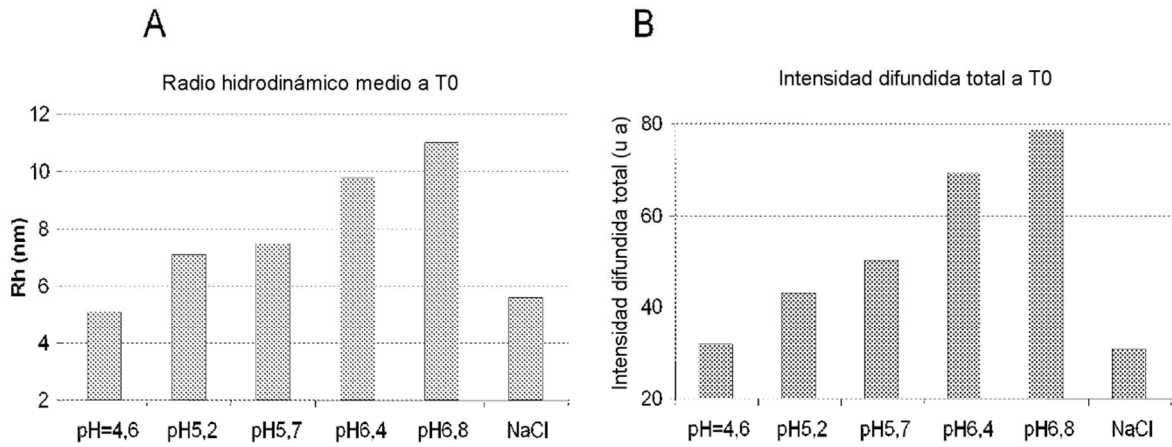


Figura 1

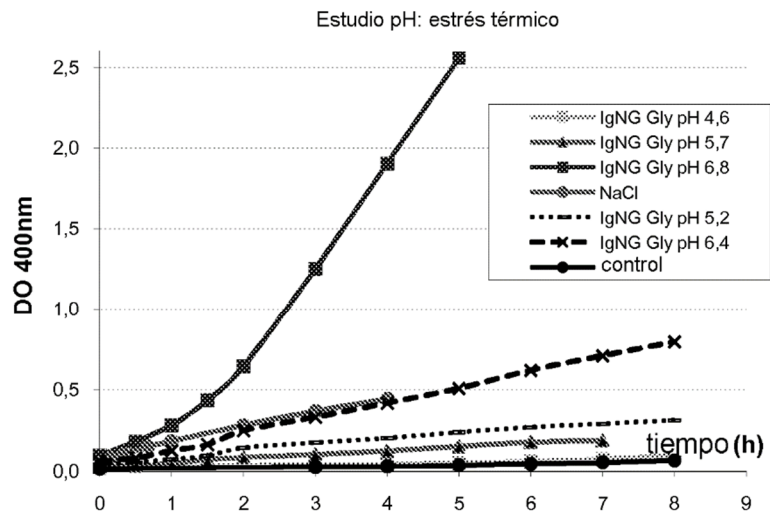


Figura 2



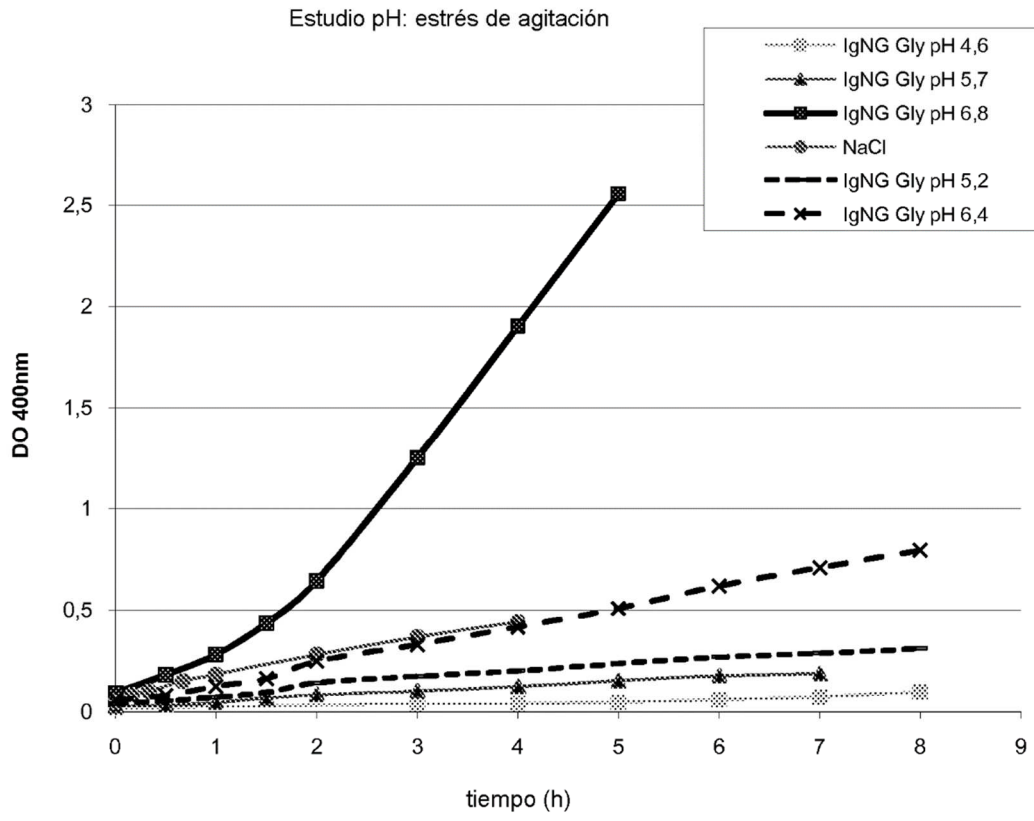


Figura 3