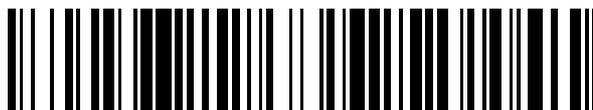


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 674**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2016 E 16174019 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3254671**

54 Título: **Composición de inmunoglobulinas de alta concentración para aplicaciones farmacéuticas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2020

73 Titular/es:

**OCTAPHARMA AG (100.0%)
Seidenstrasse 2
8853 Lachen, CH**

72 Inventor/es:

**AHRER, KARIN;
KAAR, WALTRAUD y
RÖSSL, ULRICH**

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 770 674 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 de alta concentración para aplicaciones farmacéuticas

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a una composición líquida que comprende una alta concentración de inmunoglobulinas con propiedades mejoradas de manipulación, administración y almacenamiento.

10 **Antecedentes de la invención**

El sistema inmunitario usa inmunoglobulinas o anticuerpos para identificar y neutralizar patógenos como virus y bacterias. Por consiguiente, los concentrados de inmunoglobulinas humanas se han utilizado durante mucho tiempo para el tratamiento y la prevención de enfermedades tales como enfermedades infecciosas e inmunodeficiencias.

15 Las preparaciones de inmunoglobulinas generalmente se administran por vía intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.). Si la administración es a través de vía s.c. o i.m., las preparaciones de inmunoglobulinas deben tener un volumen bajo y, por lo tanto, una concentración alta de inmunoglobulinas para la conveniencia del paciente, ya que los grandes volúmenes aplicados en el tejido subcutáneo o muscular pueden provocar irritación y dolor y pueden prolongar el tiempo de aplicación.

20 Sin embargo, un aumento en la concentración de proteínas influye en la estabilidad y agregación de las proteínas y en la viscosidad de la composición. Además de los aspectos de estabilidad conformacional, la asociación y la agregación desempeñan un obstáculo importante en altas concentraciones de proteínas, ya que se espera que una mayor tasa de colisiones moleculares aumente la asociación de proteínas intermoleculares y la posterior agregación.

25 Por otra parte, las preparaciones de inmunoglobulinas generalmente experimentan una subida exponencial de la viscosidad durante el aumento de la concentración de inmunoglobulinas, en particular debido a la tendencia a la agregación de las proteínas.

30 Un aumento de la viscosidad de la formulación limita la inyectabilidad y la aplicabilidad para administración subcutánea a través de agujas de jeringa delgadas. Adicionalmente, la alta viscosidad puede imponer problemas durante el procesamiento, tal como durante la diafiltración o el llenado. Por consiguiente, es deseable mantener la viscosidad de los fármacos para infundir o inyectar lo más baja posible.

35 También es deseable proporcionar preparaciones de inmunoglobulinas conformacionalmente estables que tengan una larga estabilidad de almacenamiento. En general, la estabilidad conformacional de las inmunoglobulinas es alta cerca del punto isoeléctrico (pI) (Mueller et al. 2013).

40 Sin embargo, la solubilidad de las proteínas es mínima en el pI (Wang et al., 2008), lo que puede convertirse en un problema particularmente para las preparaciones de IgG de mayor concentración.

45 McCue y sus colegas demostraron que los pI en IgG en plasma humano oscilan entre pH 4,5 y 11, mostrando un máximo claro entre pH 7 y pH 9. El grupo también encontró un aumento de especies oligoméricas y alteración de las propiedades de unión a pH neutro y superior (McCue et al. 1986).

50 Por otro lado, en condiciones ácidas, la estabilidad conformacional disminuye debido a una mayor carga superficial de las proteínas (Chi et al., 2003). De forma notable, los valores de pH inferiores a 4 en particular pueden conducir a la fragmentación y agregación de IgG (Bolli et al., 2010; Wang et al., 2007; Vermeer et al., 2000 o Szenczi et al., 2006).

55 Una forma de reducir la viscosidad de tales concentrados de inmunoglobulinas es alterando el pH de los concentrados a valores altos o bajos. El documento WO 02/30463 A2, por ejemplo, describe un método para reducir la viscosidad de una composición de inmunoglobulinas concentradas con una concentración de al menos 80 g/l alterando el pH de la formulación a valores más bajos (4,0 a 5,3) o elevados (6,5 a 12,0), se añaden tampones o sales en una concentración de 50 a 200 mM. Como alternativa, el documento sugiere aumentar la fuerza iónica total de la formulación mediante la adición de sales o componentes tampón.

60 La reducción del pH conduce a una disminución en la estabilidad de la proteína y la tendencia a desplegarse tal como se muestra en el Ejemplo 1 y la Fig. 1. Durante el almacenamiento a largo plazo, la consecuencia es una mayor fragmentación de proteínas. Por otro lado, un aumento del pH a valores en el intervalo de 6,5 a 9 disminuye la solubilidad de las inmunoglobulinas, mientras que los valores de pH superiores a 10 inducen inestabilidad conformacional durante el almacenamiento a largo plazo.

65 Para otras formulaciones farmacéuticas, a saber, formulaciones que comprenden anticuerpos monoclonales, el documento WO 2013/063510 A1 describe el uso de aminoácidos para la reducción de la viscosidad.

Por otra parte, el documento US 4.587.966 describe preparaciones de inmunoglobulinas estabilizadas con histidina y un método para su fabricación. Las preparaciones descritas en ese documento son en particular preparaciones de IgG con una concentración de gamma globulina al 5 % o menos e histidina a una concentración de aproximadamente 0,025 M a 0,2 M.

5 Sin embargo, no se sabe si estos hallazgos son aplicables a inmunoglobulinas derivadas de plasma humano altamente concentradas y, de ser así, cuál de la miríada de aminoácidos y combinaciones de aminoácidos tendría un efecto reductor de la viscosidad.

10 Así, es un objeto de la invención proporcionar formulaciones para estabilizar inmunoglobulinas derivadas de plasma humano a altas concentraciones.

Sumario de la invención

15 La presente invención, *entre otras cosas*, en el hallazgo de que la formulación de composiciones de inmunoglobulinas altamente concentradas de acuerdo con las reivindicaciones con la combinación de un determinado intervalo de pH ligeramente ácido, en particular de pH 5,5 a 5,9 y la adición de un aminoácido estabilizante, seleccionado de glicina o prolina, así como del aminoácido reductor de la viscosidad, seleccionado de histidina o arginina, en determinadas concentraciones de aminoácidos, conducen a composiciones que tienen una viscosidad reducida y una mayor estabilidad.

20 Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición líquida que comprende inmunoglobulinas policlonales, al menos un aminoácido modulador de la viscosidad, seleccionado de arginina e histidina, y al menos un aminoácido estabilizante, seleccionado de glicina y prolina, en donde más del 90 % de las inmunoglobulinas policlonales están en forma de monómeros o dímeros y menos del 5 % en forma de polímeros, y en donde la concentración de inmunoglobulinas en la composición es superior a 160 g/l y el pH está en el intervalo de 5,5 a 5,9.

25 Esta combinación conduce a una composición de inmunoglobulinas altamente concentradas que tiene una viscosidad lo suficientemente baja como para permitir un buen procesamiento de la composición, así como suficiente inyectabilidad. Por otra parte, las inmunoglobulinas en las composiciones son suficientemente estables para el almacenamiento a largo plazo. Esto significa que se minimiza la generación de fragmentos de inmunoglobulinas y las inmunoglobulinas tienen una baja tendencia a formar polímeros.

30 En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición líquida de acuerdo con el primer aspecto para su uso en tratamiento médico.

35 De acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere al método de formulación de una composición de inmunoglobulinas policlonales con una concentración de inmunoglobulinas superior a 160 g/l, que comprende las etapas de proporcionar una composición de inmunoglobulinas policlonales con una concentración de inmunoglobulinas superior a 160 g/l, ajustando el pH de la composición a un valor en el intervalo de 5,5 a 5,9, y añadiendo al menos un aminoácido estabilizante, seleccionado de glicina y prolina, y al menos un aminoácido modulador de la viscosidad, seleccionado de arginina e histidina.

Descripción de las figuras

45 La Fig. 1 muestra curvas de transición térmica de composiciones que comprenden IgG derivada de plasma humano. Las curvas de transición térmica representan la capacidad calorífica molar de la composición en función de la temperatura y se determinan mediante mediciones por DSC (por sus siglas en inglés). Las composiciones comprenden IgG, NaCl 20 mM, acetato de sodio 20 mM y difieren en pH como se indica en la figura (pH 4,5, 5,0, 5,5, 5,9, 6,2). Los máximos locales de las curvas representan transiciones de desplegamiento. Se identifican para cada curva las temperaturas exactas del primer máximo (T_m 1). Las temperaturas T_m 1 para dichas soluciones de IgG a varios valores de pH fueron 61,3 °C para pH = 4,5, 66,2 °C para pH = 5,0, 69,2 °C para pH = 5,5, 70,6 para pH = 5,9 y 71,0 °C a pH = 6,2.

50 La Fig. 2 muestra cualitativamente la relación entre el pH de una preparación de IgG y la fracción de polímeros de IgG. La fracción de polímeros de IgG de la composición de IgG (NaCl 20 mM, acetato de sodio 20 mM) se mide por SEC y se define en % basándose en la IgG total a varios valores de pH.

55 La Fig. 3 muestra curvas de transición térmica de composiciones que comprenden IgG derivada de plasma humano. Las curvas de transición térmica representan la capacidad calorífica molar de la composición en función de la temperatura y se determinan mediante mediciones por DSC (por sus siglas en inglés). Las composiciones comprenden IgG, NaCl 20 mM, acetato de sodio 20 mM y tienen un pH de 5,7. Las composiciones comprenden además uno cualquiera de arginina, glicina, prolina o histidina como se indica en la figura a una concentración de 230 mM. Los máximos locales de las curvas representan transiciones de desplegamiento.

65

- La Fig. 4 muestra la influencia de la concentración de diferentes aminoácidos en la viscosidad dinámica de una composición que comprende IgG derivada de plasma humano. A una composición que comprende NaCl 20 mM y acetato sódico 20 mM con un pH de 5,7, se añaden aminoácidos a una concentración final de 250 mM y se determina la viscosidad dinámica resultante (eje Y). Las composiciones resultantes contienen glicina y diferentes fracciones molares (indicadas en el eje X) de histidina o arginina. Con el aumento de la concentración de arginina o histidina, la viscosidad dinámica se reduce significativamente.
- La Fig. 5 muestra curvas de transición térmica de composiciones que comprenden IgG derivada de plasma humano. Las curvas de transición térmica representan la capacidad calorífica molar de la composición en función de la temperatura y se determinan mediante mediciones por DSC (por sus siglas en inglés). Las composiciones comprenden IgG, NaCl 20 mM, acetato de sodio 20 mM y tienen un pH de 5,7. Además, las composiciones medidas contienen bien arginina 50 mM, arginina 230 mM o una mezcla de arginina 75 mM y glicina 175 mM o ningún aminoácido ("Sin aditivo") como se indica en la figura.
- La Fig. 6 muestra la correlación de la concentración de IgG y la viscosidad dinámica de las composiciones de IgG con y sin aditivos de aminoácidos. Usando una combinación de arginina y glicina, es posible reducir la viscosidad en soluciones de IgG derivada de plasma humano altamente concentradas con respecto a la formulación natural, no estabilizada con aminoácidos. Las curvas representan composiciones de IgG con NaCl 20 mM, acetato de sodio 20 mM a pH 5,7 y concentraciones variables de IgG. Las composiciones representadas por puntos negros contienen arginina 75 mM y glicina 175 mM, las composiciones representadas por círculos no contienen aditivos ("Sin aditivos").

Descripción detallada

De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición líquida que comprende inmunoglobulinas policlonales, al menos un aminoácido modulador de la viscosidad, seleccionado de arginina e histidina, y al menos un aminoácido estabilizante, seleccionado de glicina y prolina, en donde más del 90 % de las inmunoglobulinas policlonales están en forma de monómeros o dímeros y menos del 5 % en forma de polímeros, y en donde la concentración de inmunoglobulinas en la composición es superior a 160 g/l y el pH está en el intervalo de 5,5 a 5,9.

Las inmunoglobulinas policlonales de acuerdo con la presente invención derivan del plasma humano. Las inmunoglobulinas policlonales de acuerdo con la invención pueden comprender inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA), inmunoglobulina M (IgM). Las inmunoglobulinas policlonales son en particular un concentrado de IgG humana. Un concentrado de IgG generalmente comprende diferentes impurezas, tal como otras inmunoglobulinas, como IgA o IgM, y otras proteínas de la sangre, tal como la albúmina.

El componente principal de las preparaciones de inmunoglobulinas son las inmunoglobulinas. Así, en la composición de acuerdo con la invención, el contenido de inmunoglobulinas es más del 90 %, preferentemente más del 95 % y más preferentemente más del 98 % basándose en la proteína total.

La proteína total, como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración de proteína total determinada con el ensayo Biuret, que se basa en el desarrollo de un color violeta cuando los iones de cobre (II) reaccionan con grupos amino a pH alcalino.

Un concentrado de inmunoglobulina G (IgG) de acuerdo con la invención puede prepararse, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2005/082937 A2. Por consiguiente, el material de partida fue Fracción I+II+III preparada a partir de un grupo de plasma de acuerdo con la tecnología de fracción de etanol frío (tal como Cohn, Kistler-Nitschmann o modificaciones de los mismos). La Fracción I+II+III reconstituida puede procesarse después usando precipitación con caprilato y cromatografías de intercambio aniónico. Las etapas específicas de seguridad de los patógenos comprendieron el tratamiento con solventes/detergentes (S/D), la posterior eliminación de reactivos S/D, así como la nanofiltración.

Para los métodos de mejora del producto dirigidos a una reducción adicional de la carga de impurezas, se podrían incorporar medidas adicionales, por ejemplo, para la reducción de las hemaglutininas mediante contacto con resinas de afinidad basándose en determinados trisacáridos tal como se describe en el documento WO-A2-01/27623. Estos métodos de preparación de inmunoglobulinas en general incluyen al menos un tratamiento con solventes/detergentes (S/D) y una etapa de nanofiltración por razones de seguridad del patógeno.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunoglobulina" se refiere a proteínas que se unen a antígenos específicos. Las inmunoglobulinas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos y humanizados e incluyen las siguientes clases: IgA, IgG, IgM, IgD, y IgE. Las inmunoglobulinas generalmente comprenden dos cadenas pesadas y cadenas ligeras idénticas. Sin embargo, el término inmunoglobulina como se usa en el presente documento también incluye fragmentos tales como las inmunoglobulinas de cadena sencilla, así como dímeros, polímeros o agregados de proteínas.

Las inmunoglobulinas policlonales en la composición líquida de acuerdo con la invención muestran un bajo nivel de polimerización, confirmado por medición de distribución por tamaño molecular. Esto significa que las inmunoglobulinas policlonales comprenden al menos un 90 % de monómeros y dímeros como una suma y como máximo un 5 % de polímeros. Por otra parte, las inmunoglobulinas policlonales muestran solo un bajo grado de fragmentación. Esto significa que como máximo el 5 % de las inmunoglobulinas policlonales son fragmentos. Los porcentajes se calculan a partir del área bajo la curva para agregados, dímeros, monómeros y fragmentos medidos por cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño. Cabe señalar que no se diferencia estrictamente dentro de este documento entre agregados y polímeros o entre agregación y polimerización, ya que la persona experta es consciente de que las moléculas o grupos de moléculas, y, respectivamente, su proceso de formación, se sabe que tienen mayor peso molecular que el peso de los dímeros de inmunoglobulinas. Como consecuencia, la suma total de monómeros, dímeros, polímeros y fragmentos de inmunoglobulinas es del 100 %. El porcentaje de polímeros como máximo del 5 % está significativamente por debajo del umbral requerido de acuerdo con la farmacopea.

En una realización preferida de la invención, las inmunoglobulinas policlonales comprenden al menos el 94 % de monómeros y dímeros como suma, como máximo el 5 % de polímeros y como máximo el 5 % de fragmentos. Esto significa, como los porcentajes siempre se basan en la suma total de monómeros, dímeros, polímeros y fragmentos, que la suma de polímeros y fragmentos es inferior al 6 %.

La distribución del tamaño molecular tal como se usa en el presente documento se mide mediante cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño (SE-HPLC o SEC por sus siglas en inglés) con un gel de sílice hidrófilo adecuado para el fraccionamiento de proteínas globulares con masas moleculares relativas de 10.000 a 500.000 y mediante detección con un espectrofotómetro a 280 nm. El resultado se informa como % del área bajo la curva para agregados, dímeros, monómeros y fragmentos.

La concentración de inmunoglobulinas, en la composición líquida de acuerdo con la invención es superior a 160 g/l. Las concentraciones de inmunoglobulinas por debajo de este valor no se consideran como una composición de inmunoglobulinas altamente concentrada. Las composiciones de inmunoglobulinas de baja concentración no experimentan los problemas de viscosidad como las composiciones de inmunoglobulinas altamente concentradas.

De acuerdo con la invención, si no se indica de otra manera, la concentración de inmunoglobulinas se determina mediante SEC. La SEC determina la inmunoglobulina con el mismo equipo utilizado para la distribución del tamaño molecular. Para obtener resultados cuantitativos, es necesario comparar el área bajo la curva obtenida de una muestra de inmunoglobulinas con los valores obtenidos mediante el establecimiento de una curva de calibración con un material de calibración de concentración de inmunoglobulinas conocida. Para composiciones de inmunoglobulinas suficientemente puras, no son necesarias correcciones adicionales del valor obtenido.

El pH de la composición líquida está en el intervalo de 5,5 a 5,9. Como se describe en la introducción de la solubilidad de IgG y con eso, la propensión de la IgG a formar polímeros y agregados aumenta cuando se acerca a valores de pH neutros. Sin embargo, como se muestra en el ejemplo presentado en la figura 2, el porcentaje de polímeros sigue siendo aceptable.

No se recomiendan valores de pH más altos ya que esto podría conducir a una agregación significativamente más alta. Así, el pH máximo de acuerdo con la invención es 5,9.

Además, hay un límite inferior para el pH de la composición líquida de inmunoglobulinas. Como se muestra en el ejemplo 1, las estabildades termodinámicas de las inmunoglobulinas en las composiciones disminuyen significativamente a valores de pH de 4,5 y 5,0 en comparación con los valores de pH más altos de 5,5 a 6,2. A partir de esto, se supone que un valor de pH de 5,2 podría ser aceptable con respecto a la estabilidad y fragmentación de las proteínas. Sin embargo, con un intervalo de pH entre pH 5,5 y pH 5,9 es posible conservar condiciones termodinámicamente estables sin acercarse al máximo de la distribución del pl.

Tal como se usa en el presente documento, si no se indica lo contrario, la viscosidad de la composición es la viscosidad dinámica. De acuerdo con la invención, la viscosidad dinámica se determina con el Microviscosímetro automatizado "AMVn" de Anton Paar® GmbH (Austria) a una temperatura de +20,0 °C y un ángulo de inclinación capilar de 50°. La determinación se realiza de acuerdo con el manual de instrucciones del instrumento. El resultado de la medición es la viscosidad cinemática. Para obtener la viscosidad dinámica, además, se determina la densidad con el densitómetro "DMA 4500M" también de Anton Paar® GmbH (Austria) a la misma temperatura. El producto de la viscosidad cinemática y la densidad es la viscosidad dinámica.

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) se utiliza para evaluar la estabilidad de las proteínas frente a la desnaturalización térmica. En relación con una referencia calorimétrica, se mide el cambio de entalpía en el desplegamiento térmico de proteínas y el punto medio de desplegamiento térmico (T_m) de transiciones simples o múltiples. La DSC se considera una técnica razonable para la estimación predictiva de la agregación de proteínas durante un determinado tiempo deseado (vida útil), especialmente en los casos en que se desea una clasificación de las condiciones (de formulación) en términos de estabilidad conformacional (Mueller et al. 2013 y Weiss et al. 2009).

Durante la agregación prolongada por almacenamiento, puede producirse una polimerización y fragmentación y una reducción correspondiente de la suma de la fracción de monómeros y dímeros de la inmunoglobulina.

5 Cabe señalar que no se diferencia estrictamente dentro de este documento entre agregados y polímeros o entre agregación y polimerización, ya que la persona experta es consciente de que las moléculas o grupos de moléculas, y, respectivamente, su proceso de formación, se sabe que tienen mayor peso molecular que el peso de los dímeros de inmunoglobulinas.

10 "Estabilidad de almacenamiento" durante el período de tiempo definido como se usa en el presente documento significa que las inmunoglobulinas en la composición tienen una distribución de tamaño molecular de más del 90 % de monómeros y dímeros como suma, como máximo el 5 % de polímeros y como máximo el 5 % de fragmentos y en donde la suma total de monómeros, dímeros, polímeros y fragmentos es del 100% después del almacenamiento durante el período de tiempo definido. Por ejemplo, si se define que la composición de inmunoglobulinas tiene una
15 estabilidad de almacenamiento de sesenta meses, significa que durante al menos 60 meses la distribución del tamaño molecular muestra más del 90% de monómeros y dímeros como suma, como máximo el 5 % de polímeros y como máximo el 5 % de fragmentos.

20 La composición líquida de acuerdo con la invención comprende dos tipos de aminoácidos. El primer tipo es el aminoácido modulador de la viscosidad, seleccionado de arginina e histidina. Como se muestra en el ejemplo 4, la adición de cualquiera de arginina e histidina a una composición de inmunoglobulinas conduce a una reducción significativa de la viscosidad de la composición con alta concentración de inmunoglobulinas. Con estos dos aminoácidos moduladores de la viscosidad es posible ajustar la viscosidad de la formulación a valores que son preferentes para administrar la composición mediante una jeringa.

25 El segundo tipo de aminoácido en la composición líquida de acuerdo con la invención es el aminoácido estabilizante. El amino estabilizante se selecciona de glicina y prolina. Como se muestra en el ejemplo 3, tanto la adición de glicina o prolina conduce a un aumento significativo en la estabilidad térmica.

30 Por otra parte, como se muestra en los ejemplos 5 y 6, la combinación del aminoácido modulador de la viscosidad y el aminoácido estabilizante tiene ambos efectos. Del ejemplo 5 incluso parece que la combinación de aminoácidos estabilizantes y moduladores de la viscosidad conduce a la misma estabilización que el aminoácido estabilizante solamente. Asimismo, el aminoácido estabilizante no tiene un impacto negativo sobre la viscosidad de la composición cuando se añade al aminoácido modulador de la viscosidad.

35 De acuerdo con una realización, la concentración de inmunoglobulinas de la composición líquida está en el intervalo de más de 160 a 300 g/l, preferentemente la concentración de inmunoglobulinas está en el intervalo de más de 160 a 260 g/l. Cuando la concentración de inmunoglobulinas supera los 300 g/l, ya no es posible, con los componentes de acuerdo con la presente invención, disminuir la viscosidad al intervalo en el que la composición líquida se puede
40 manipular o administrar con una jeringa. Como se muestra en los ejemplos, se pueden obtener formulaciones de hasta 260 g/l con una viscosidad razonable y estabilidad de almacenamiento a largo plazo.

45 El pH de la composición líquida está en el intervalo de 5,5 a 5,9. El valor de pH de 5,9 tiene una distancia suficiente desde el punto isoeléctrico de las inmunoglobulinas, en particular de IgG. Por consiguiente, el valor de 5,9 conduce a una menor formación de polímeros o agregados en comparación con el valor de 6,2. Por lo tanto, mantener el pH por debajo de 5,9 puede conducir a formulaciones más estables y menos agregadas. Como se muestra en la figura 2, la inestabilidad terminal aumenta fuertemente al disminuir el pH de 5,5 a 5,0. Así, incluso si el pH de 5,2 pudiera ser adecuado para la composición líquida de acuerdo con la invención, un mínimo de pH 5,5 proporciona una mayor
50 estabilidad de las inmunoglobulinas en la composición líquida. Se obtuvieron muy buenos resultados con respecto a la viscosidad y la estabilidad con un pH de 5,7. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, el pH está en el intervalo de 5,6 a 5,8, en particular el pH es de aproximadamente 5,7.

De acuerdo con una realización, la composición líquida se caracteriza por una concentración de proteínas en el intervalo de más de 160 a 180 g/l y una viscosidad dinámica en el intervalo de 5 a ≤ 12 mPa*s. De acuerdo con una
55 realización alternativa, la composición líquida se caracteriza por una concentración de proteínas en el intervalo de más de 180 a 220 g/l y una viscosidad dinámica en el intervalo de > 12 a ≤ 35 mPa*s. De acuerdo con una realización alternativa adicional, la composición líquida se caracteriza por una concentración de proteínas en el intervalo de más de 220 a 260 g/l y una viscosidad dinámica en el intervalo de > 35 a ≤ 100 mPa*s.

60 De acuerdo con una realización de la presente invención, la concentración del uno o más aminoácidos estabilizantes y el uno o más aminoácidos moduladores de la viscosidad, es decir, la concentración total de los aminoácidos estabilizantes y unos aminoácidos moduladores de la viscosidad está en el intervalo de cien a 400 mM. Por debajo de una concentración total de 100 mM, la concentración de los aminoácidos moduladores y estabilizantes de la viscosidad individual no será suficiente para proporcionar una composición de inmunoglobulinas altamente concentrada con una
65 viscosidad adecuada y estabilidad a largo plazo.

De acuerdo con una realización preferida, la concentración total de aminoácidos estabilizantes y reductores de la viscosidad está en el intervalo de 150 a 350 mM. Como se muestra en los ejemplos, en particular en el ejemplo 7, la concentración total de aminoácidos dentro de este intervalo condujo a una estabilidad de almacenamiento a largo plazo de las composiciones de inmunoglobulinas.

Se obtuvieron resultados particularmente buenos con una concentración total de aminoácidos estabilizantes y moduladores de la viscosidad de aproximadamente 250 mM. Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida, la concentración total de aminoácidos estabilizantes y moduladores de la viscosidad está en el intervalo de 200 a 300 mM, más preferentemente en el intervalo de 225 a 275 mM, lo más preferentemente de aproximadamente 250 mM.

De acuerdo con una realización, el aminoácido estabilizante es glicina y el aminoácido modulador de la viscosidad es arginina o una histidina. De acuerdo con una realización alternativa, el aminoácido estabilizante es prolina y el aminoácido modulador de la viscosidad es arginina o histidina. De acuerdo con una realización alternativa adicional, el aminoácido estabilizante es glicina o prolina y los aminoácidos moduladores de la viscosidad son arginina e histidina. De acuerdo con una realización alternativa adicional, los aminoácidos estabilizantes son glicina y prolina y el aminoácido modulador de la viscosidad es arginina o histidina. De acuerdo con una realización adicional, los aminoácidos estabilizantes son glicina y prolina y los aminoácidos moduladores de la viscosidad son arginina e histidina. De acuerdo con una realización preferida, el aminoácido estabilizante es glicina y el aminoácido modulador de la viscosidad es arginina.

De acuerdo con una realización, la concentración del aminoácido modulador de la viscosidad en la composición líquida está en el intervalo de 50 a 100 mM. Por debajo de 50 mM, el efecto reductor de la viscosidad de los aminoácidos moduladores de la viscosidad generalmente no es suficiente para hacer que la viscosidad de la composición tenga un valor adecuado.

Por encima de un valor de 100 mM, el efecto desestabilizante de los aminoácidos moduladores de la viscosidad se vuelve demasiado fuerte, por lo que las concentraciones extremadamente altas de un aminoácido estabilizante estarían en él para contrarrestar el efecto desestabilizante y, en consecuencia, la concentración total de aminoácidos excedería los 400 mM.

Preferentemente, la concentración de los aminoácidos moduladores de la viscosidad está en el intervalo de 60 a 90 mM. Como se muestra en los ejemplos en particular para la arginina, se encontró que una concentración de 75 mM proporciona los mejores resultados respecto a la disminución de la viscosidad y la estabilización. Así, preferentemente, la concentración de los aminoácidos moduladores de la viscosidad está en el intervalo de 65 a 85 mM, más preferentemente en el intervalo de 70 a 80 mM y en particular aproximadamente 75 mM. De acuerdo con una realización preferida, la composición líquida contiene arginina en la concentración de 70 a 80 mM.

De acuerdo con una realización, la concentración del aminoácido estabilizante está en el intervalo de 80 a 300 mM. Por debajo de la concentración de 80 mM, se supone que el efecto estabilizante no puede contrarrestar el efecto desestabilizante de los aminoácidos moduladores de la viscosidad. Por encima de la concentración de 300 mM, la concentración total de aminoácidos alcanza un intervalo en el que los aminoácidos podrían interferir con la función de las inmunoglobulinas.

Se encontró que la concentración preferida en particular para el aminoácido estabilizante glicina era 175 mM, véase el Ejemplo 7. Así, de acuerdo con una realización preferida, la concentración de los aminoácidos estabilizantes está en el intervalo de 130 a 220 mM. De acuerdo con una realización más preferida, la concentración está en el intervalo de 160 a 190 mM. La concentración más preferida de los aminoácidos estabilizantes está en el intervalo de 170 a 180 mM. En particular, la concentración es aproximadamente 175 mM. De acuerdo con una realización preferida, la composición líquida contiene los aminoácidos estabilizantes en la concentración de 170 a 180 mM.

Como se muestra en el ejemplo 7, las inmunoglobulinas en la composición líquida de acuerdo con la invención muestran estabilidad de almacenamiento durante un largo período de tiempo tanto a bajas temperaturas en el intervalo de 2 a 8 °C como a temperatura ambiente, que está en el intervalo de 15 a 27 °C.

De acuerdo con una realización, la estabilidad de almacenamiento de las inmunoglobulinas en las composiciones líquidas es de al menos 40 meses a una temperatura de 2 a 8 °C. Preferentemente, el plazo de estabilidad de almacenamiento es de al menos 60 meses, más preferentemente de al menos 69 meses a la temperatura de 2 a 8 °C. A una temperatura de almacenamiento de 23 a 27 °C, el plazo de estabilidad de almacenamiento de las inmunoglobulinas en la composición líquida de acuerdo con la invención es de al menos 12 meses de almacenamiento, más preferentemente de al menos 24 meses de almacenamiento y lo más preferentemente de al menos 40 meses de almacenamiento.

Otros excipientes o estabilizantes también pueden estar presentes en la preparación de inmunoglobulinas de la invención, pero no son necesarios para obtener la estabilidad reivindicada. De acuerdo con una realización, la composición líquida puede contener uno o más de tensioactivo, detergente o sacárido. La composición líquida también puede contener uno o más de cada uno de tensioactivo, detergente o sacárido. Ejemplos de sacáridos adecuados son

maltosa, sorbitol, manosa, melezitosa o glucosa. Un ejemplo de un tensioactivo adecuado es polisorbato. El polisorbato está presente preferentemente en el intervalo de 5 a 60 mg/l.

5 De acuerdo con una realización, la composición líquida contiene adicionalmente una sal seleccionada de acetato de sodio, cloruro de sodio o citrato de dihidrógeno de sodio. Preferentemente, la composición líquida comprende acetato de sodio y NaCl. El acetato de sodio está presente preferentemente en la concentración de 10 a 50 mM. Más preferentemente, el acetato de sodio está presente preferentemente en la concentración de aproximadamente 20 mM. NaCl está presente preferentemente en la concentración de 10 a 50 mM. Más preferentemente, NaCl está presente preferentemente en la concentración de aproximadamente 20 mM. De acuerdo con una realización, tanto el acetato de sodio como el NaCl están presentes en una concentración de aproximadamente 20 mM.

10 De acuerdo con una realización de la presente invención, la composición líquida está prácticamente libre de factores trombogénicos y tiene menos de 2 mIU/ml de actividad similar a FXIa que se refiere a una solución de proteína total al 5 % que se determina mediante el Ensayo de generación de trombina (TGA, por sus siglas en inglés) de Technoclone (Austria) utilizando el patrón de referencia NIBSC FXIa.

15 De acuerdo con una realización, la composición líquida de la presente invención tiene títulos de hemaglutininas reducidos a < 16 para anti-A y ≤ 8 para anti-B cuando se determinan mediante la Prueba de Coombs Directa.

20 De acuerdo con la invención, la Prueba de Coombs Directa se lleva a cabo de acuerdo con el protocolo definido en la Farmacopea Europea, En resumen, los anticuerpos anti-A o anti-B se ponen en contacto dentro de este ensayo con papaína y se determina el título, que es la dilución más alta con la aglutinación observada.

25 Las realizaciones preferidas de la presente invención son preparaciones de inmunoglobulina G con un contenido de inmunoglobulina G de 185-215 g/l, un valor de pH de 5,5-5,9 o 5,6-5,9 y una viscosidad dinámica de > 12 y hasta 30 mPa*s, siendo formuladas con glicina 150-210 mM y arginina 50-105 mM. Estas realizaciones preferidas tienen una estabilidad de almacenamiento de al menos 12 meses a 23-27 °C y una estabilidad de almacenamiento de al menos 24 meses cuando se almacenan refrigeradas a 2-8 °C, habiéndose determinado también la estabilidad de las preparaciones refrigeradas de inmunoglobulina G después de 67 y 69 meses y todavía se encontraron estables de acuerdo con los criterios definidos anteriormente.

30 La inmunoglobulina de acuerdo con la invención se puede usar en el tratamiento o prevención de una variedad de enfermedades. Así, de acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición líquida que comprende una alta concentración de inmunoglobulinas policlonales para su uso en tratamiento médico. El tratamiento médico de acuerdo con la invención incluye prevención y terapia.

35 En otras palabras, de acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se refiere al tratamiento o prevención de enfermedades mediante la administración de la composición líquida que comprende una alta concentración de inmunoglobulinas policlonales al paciente.

40 La composición líquida para su uso de acuerdo con el segundo aspecto comprende al menos un aminoácido estabilizante y al menos un aminoácido modulador de la viscosidad. Además, la composición líquida de acuerdo con el segundo aspecto en particular tiene un pH en el intervalo de 5,5 a 5,9. En particular, la composición líquida de acuerdo con el segundo aspecto es en particular una composición líquida definida de acuerdo con el primer aspecto.

45 El tratamiento médico incluye el tratamiento y la prevención de enfermedades tales como inmunodeficiencia, como agammaglobulinemia congénita, hipogammaglobulinemia, inmunodeficiencia variable común, inmunodeficiencia combinada grave, deficiencias de subclases de IgG con infecciones recurrentes, mieloma, leucemia linfática crónica con hipogammaglobulinemia secundaria grave, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve (MCI por sus siglas en inglés), síndrome de autoinmunodeficiencia adquirida (SIDA), síndrome de Wiskott-Aldrich e inmunodeficiencia combinada severa (SCID por sus siglas en inglés), púrpura trombocitopénica idiopática aguda y crónica (ITP, por sus siglas en inglés), trasplante alogénico de médula ósea (BMT por sus siglas en inglés), Enfermedad de Kawasaki, Síndrome de Guillan-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP por sus siglas en inglés), neuropatía motora multifocal, esclerosis múltiple, Miastenia Grave, síndrome de Eaton-Lambert, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, escleroderma sistémico, vasculitis, granulomatosis de Wegener, síndrome de Sjögren, neutropenia autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, neutropenia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, asma, síndrome de choque séptico, síndrome de fatiga crónica, psoriasis, choque tóxico o infecciones recurrentes.

50 El tratamiento o prevención comprende preferentemente administrar a un paciente una cantidad eficaz de la composición líquida. La composición líquida puede administrarse, por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica.

65 Las composiciones farmacéuticas de las realizaciones se pueden preparar y administrar a un sujeto mediante cualquier método bien conocido en la técnica de la farmacia. Véase, p. ej., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Hardman et al., eds., McGraw-Hill Professional (10th ed., 2001); Remington: The Science and Practice

of Pharmacy, Gennaro, ed., Lippincott Williams & Wilkins (20th ed., 2003); y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Ansel et al. (eds), Lippincott Williams & Wilkins (7th ed., 1999). Además, las composiciones farmacéuticas de las realizaciones también pueden formularse para incluir otros fármacos o agentes biológicos médicamente útiles.

5 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención comprenden la composición líquida con una cantidad eficaz de inmunoglobulinas, y la composición líquida se formula adicionalmente con al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 El vehículo farmacéuticamente aceptable puede cualquiera conocido o establecido en la técnica. Vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen agua apirógena estéril y solución salina tamponada con fosfato apirógena estéril.

15 Otras formas de vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse para las presentes realizaciones incluyen aglutinantes, disgregantes, tensioactivos, acelerantes de la absorción, agentes de retención de la humedad, absorbentes, lubricantes, materiales de relleno, extensores, agentes que imparten humedad, conservantes, estabilizantes, emulsionantes, agentes solubilizantes, sales que controlan la presión osmótica, agentes diluyentes tales como tampones y excipientes generalmente usados dependiendo de la forma de uso de la formulación. Estos se seleccionan y usan opcionalmente dependiendo de la dosis unitaria de la formulación resultante.

20 La composición líquida o composición farmacéutica puede administrarse a un paciente por cualquier vía de administración habitual, por ejemplo, por vía oral, vía parenteral o por inhalación. La administración parenteral incluye inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular e inyección intraperitoneal, agentes líquidos, suspensiones, emulsiones y agentes de goteo. Se prefiere la aplicación intramuscular (i.m.) y subcutánea (s.c.).

25 De acuerdo con un tercer aspecto, la invención se refiere a un método de formulación de una preparación de inmunoglobulinas policlonales con una concentración de inmunoglobulinas superior a 160 g/l, que comprende proporcionar una preparación de inmunoglobulinas policlonales con una concentración de inmunoglobulinas superior a 160 g/l, ajustando el pH de la composición a un valor en el intervalo de 5,5 a 5,9, añadiendo al menos un aminoácido estabilizante seleccionado de glicina y prolina y añadiendo al menos un aminoácido modulador de la viscosidad seleccionado de arginina e histidina.

30 El producto de este método de formulación es una composición líquida que comprende inmunoglobulinas policlonales, al menos un aminoácido estabilizante y un aminoácido modulador de la viscosidad con un pH en el intervalo de 5,5 a 5,9. Una preparación de inmunoglobulinas es en particular un concentrado de IgG que se puede obtener como se definió anteriormente.

35 De acuerdo con una realización del método, el pH se ajusta a un valor en el intervalo de 5,5 a 5,9, más preferentemente en el intervalo de 5,7 a 5,9, en particular a un pH de aproximadamente 5,8.

40 En una realización del método, se añaden componentes tampón tales como acetato de sodio o NaCl a la preparación de inmunoglobulinas antes de añadir los aminoácidos y ajustar el pH.

45 De acuerdo con una realización del método, el aminoácido estabilizante se agrega a la composición de inmunoglobulinas policlonales altamente concentrada antes de añadir el aminoácido modulador de la viscosidad y ajustar el pH. Por consiguiente, en una etapa adicional, se puede añadir el aminoácido modulador de la viscosidad antes de ajustar el pH. Como alternativa, como siguiente etapa, se ajusta el pH antes de añadir el aminoácido modulador de la viscosidad.

50 En una realización alternativa del método, el pH se ajusta antes de añadir el aminoácido estabilizante y el aminoácido modulador de la viscosidad. Por consiguiente, en la siguiente etapa se añade el aminoácido estabilizador. Como alternativa, el aminoácido modulador de la viscosidad se añade antes de la adición del aminoácido estabilizador.

55 Una realización alternativa adicional del método comprende añadir el aminoácido modulador de la viscosidad antes de añadir el aminoácido estabilizante y ajustar el pH. En este sentido, en una etapa siguiente, se puede añadir el aminoácido estabilizante antes de ajustar el pH. Como alternativa, se ajusta el pH antes de añadir el aminoácido estabilizante.

60 De acuerdo con una realización, el aminoácido modulador de la viscosidad y estabilizante se mezclan antes de añadir la mezcla a la composición de inmunoglobulinas policlonales altamente concentrada. Esta mezcla de aminoácidos se puede añadir para ajustar el pH o, alternativamente, después de ajustar el pH.

65 En una realización del método, la concentración de inmunoglobulinas de la composición líquida resultante es más de 160 g/l. Preferentemente, está en el intervalo de más de 160 a 300 g/l, más preferentemente la concentración de inmunoglobulinas está en el intervalo de más de 160 a 260 g/l.

De acuerdo con una realización preferida del método, los aminoácidos se añaden en concentraciones tales que la concentración total de aminoácidos estabilizantes y moduladores de la viscosidad en la composición líquida resultante esté en el intervalo de 150 a 350 mM. Preferentemente, la concentración total de aminoácido(s) estabilizante(s) y aminoácido(s) o aminoácidos moduladores de la viscosidad se añaden en concentraciones tales que en la composición líquida resultante la concentración total está en el intervalo de 200 a 300 mM, más preferentemente en el intervalo de 225 a 275 mM, lo más preferentemente de aproximadamente 250 mM.

De acuerdo con una realización del método, el aminoácido estabilizante es glicina y el aminoácido modulador de la viscosidad es arginina o una histidina. De acuerdo con una realización alternativa del método, el aminoácido estabilizante es prolina y el aminoácido modulador de la viscosidad es arginina o histidina. De acuerdo con una realización alternativa adicional del método, el aminoácido estabilizante es glicina o prolina y los aminoácidos moduladores de la viscosidad son arginina e histidina. De acuerdo con una realización alternativa adicional del método, los aminoácidos estabilizantes son glicina y prolina y el aminoácido modulador de la viscosidad es arginina o histidina. De acuerdo con una realización adicional del método, los aminoácidos estabilizantes son glicina y prolina y los aminoácidos moduladores de la viscosidad son arginina e histidina. De acuerdo con una realización preferida del método, el aminoácido estabilizante es glicina y el aminoácido modulador de la viscosidad es arginina.

El método de acuerdo con el tercer aspecto puede incluir la adición de cualquiera de los ingredientes enumerados para la composición líquida de acuerdo con el primer aspecto. Por consiguiente, se pueden añadir ingredientes adicionales descritos para la composición líquida del primer aspecto, en particular los excipientes tales como detergente, tensioactivo y azúcares antes, después o junto con los aminoácidos estabilizantes y moduladores de la viscosidad. Asimismo, los ingredientes se pueden añadir antes o después del ajuste del pH. De acuerdo con una realización, los excipientes se añaden después de la adición de los aminoácidos moduladores de la viscosidad y estabilizantes y después del ajuste del pH.

El método de formulación de acuerdo con el cuarto aspecto en particular da como resultado la formación de la composición líquida de acuerdo con el primer aspecto.

En un cuarto aspecto, se divulga el uso de un aminoácido estabilizador, en particular la glicina o prolina, en combinación con un aminoácido modulador de la viscosidad, en particular histidina o arginina en la formulación de una preparación de inmunoglobulinas policlonales altamente concentrada. El uso del aminoácido estabilizante y del aminoácido modulador conduce a la formación de una composición líquida que comprende aminoácidos policlonales. En particular, el uso conduce a la formación de la composición líquida de acuerdo con el primer aspecto. El experto comprenderá que el uso puede contener cualquiera de etapas del método descritos para el método de acuerdo con el tercer aspecto.

La invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: dependencia del pH de la estabilidad de las inmunoglobulinas

La inmunoglobulina G (IgG) se preparó esencialmente de acuerdo con el método descrito en el documento WO 2005/082937 A2. Por consiguiente, el material de partida fue Fracción I+II+III reconstituida, preparada a partir de un grupo de plasma y procesada usando precipitación con caprilato y cromatografías de intercambio aniónico. Las etapas específicas de seguridad de los patógenos comprendieron el tratamiento con solventes/detergentes (S/D), la posterior eliminación de reactivos S/D, así como la nanofiltración.

Después de eso, la solución que contenía la IgG obtenida se concentró por ultra/diafiltración y se formuló con diferentes tampones. Se prepararon diferentes composiciones con valores de pH de 4,5, 5,0, 5,5, 5,9 y 6,2, que contienen respectivamente NaCl 20 mM y acetato de sodio 20 mM.

Las composiciones se midieron con calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se usó un sistema MicroCal™ VP-Capillary DSC para la generación de una curva de fusión, así como para la determinación del punto medio (T_m) y el cambio de entalpía del desplegamiento de proteínas debido al calentamiento de 25 °C a 120 °C a una velocidad de 1 °C/min. Como referencia calorimétrica se usó un tampón, que tenía el mismo pH y que constaba de los mismos componentes que la muestra de proteína, excepto la proteína.

Se muestran los resultados de las mediciones en la Figura 1. Las curvas de transición térmica representan la capacidad calorífica molar de la composición en función de la temperatura y se determinan mediante mediciones por DSC (por sus siglas en inglés). Los máximos locales de las curvas representan transiciones de desplegamiento. Se identifican para cada curva las temperaturas exactas del primer máximo (T_{m1}). Las temperaturas T_{m1} para dichas composiciones de inmunoglobulinas a varios valores de pH fueron 61,3 °C para pH = 4,5, 66,2 °C para pH = 5,0, 69,2 °C para pH = 5,5, 70,6 para pH = 5,9 y 71,0 °C a pH = 6,2.

Al disminuir el pH, se puede ver un cambio de la curva de transición térmica a temperaturas más bajas en la figura 1.

Esto significa que las proteínas medidas, en particular las inmunoglobulinas en la composición, se funden a temperaturas más bajas con un pH decreciente. De esta figura puede obtenerse una disminución de la estabilidad conformacional de la inmunoglobulina derivada de plasma humano a valores de pH más bajos.

- 5 En particular, al pH de 4,5, se puede deducir una estabilidad termodinámica de las inmunoglobulinas significativamente menor a partir de los datos presentados, mientras que se puede encontrar una mayor estabilidad estructural a valores de pH de 5,5 y superiores.

10 **Ejemplo 2: dependencia del pH de la agregación de las inmunoglobulinas**

Con el fin de determinar el nivel de agregación de las composiciones que contienen inmunoglobulinas de acuerdo con el ejemplo 1, se realizó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) usando un gel de sílice hidrófilo adecuado para el fraccionamiento de proteínas globulares con masas moleculares relativas de 10.000 a 500.000 y la detección con un espectrofotómetro a 280 nm. Se calcula el área bajo las curvas del cromatograma SEC relacionado con agregados, 15 dímeros, monómeros y fragmentos. En la Figura 2, el porcentaje de polímeros determinado por la distribución de tamaño molecular en las composiciones se presenta en relación con el pH.

20 **Ejemplo 3: influencia de los aminoácidos sobre la estabilidad de las inmunoglobulinas**

En este experimento, la influencia de diferentes aminoácidos sobre la estabilidad de las inmunoglobulinas se probó usando DSC. Para esto, las composiciones de inmunoglobulinas se prepararon como se describe en el ejemplo 1. Las composiciones finalmente formuladas contienen NaCl 20 mM, acetato sódico 20 mM y 230 mM de un aminoácido seleccionado de arginina, glicina, prolina e histidina ajustadas a 5,7. Como se describe en el ejemplo 1, las curvas de transición térmica de las cuatro composiciones de inmunoglobulinas se determinaron por DSC. Los resultados se 25 representan en la Figura 3.

Por consiguiente, de la figura 3 es evidente que la adición de glicina o prolina conduce al cambio de la curva a temperaturas más altas en comparación con las curvas de las composiciones que contienen histidina o arginina. Así, tanto la glicina como la prolina pueden considerarse aminoácidos estabilizantes.

30 **Ejemplo 4: influencia de los aminoácidos sobre la viscosidad de la composición**

En la siguiente etapa se probó qué aminoácidos son adecuados para reducir la viscosidad de la composición de inmunoglobulinas. Por consiguiente, las composiciones de inmunoglobulinas se prepararon como se describe en el 35 ejemplo 1 y se formularon con acetato de sodio 20 mM y NaCl 20 mM a un pH de 5,7. Se prepararon diferentes composiciones de aminoácidos que contenían glicina sola o con fracciones molares crecientes de arginina o histidina con una concentración de aminoácidos total de 250 mM.

La viscosidad dinámica de estas composiciones de inmunoglobulinas se determinó con el Microviscosímetro automatizado "AMVn" de Anton Paar® GmbH (Austria) a una temperatura de +20,0 °C y un ángulo de inclinación capilar de 50°.

Los resultados se muestran en la Figura 4. Por consiguiente, tanto la arginina como la histidina conducen a una fuerte 40 disminución de la viscosidad dinámica con el aumento de las fracciones molares de dichos aminoácidos.

45 **Ejemplo 5 - Estabilidad de la composición de inmunoglobulinas con diferentes aminoácidos**

En la siguiente etapa, se atestiguó una combinación de arginina y glicina con respecto a su efecto sobre la estabilidad de las inmunoglobulinas en la preparación. Se preparó una composición de inmunoglobulinas como se describe en el 50 ejemplo 1 y se formuló con acetato de sodio 20 mM y NaCl 20 mM a un pH de 5,7. A la primera composición de inmunoglobulinas se añadieron glicina 175 mM y arginina 75 mM. Como comparación, se prepararon tres composiciones con arginina 50 mM, arginina 230 mM o sin aditivos. De nuevo, las curvas de transición térmica de las composiciones de inmunoglobulinas se midieron por DSC. Se muestran los resultados en la figura 5. Por consiguiente, la composición con arginina 75 mM y glicina 175 mM tiene una transición comparable a la curva a la composición sin 55 aditivos. Por el contrario, el uso de bajas cantidades de arginina (50 mM) o altas cantidades de arginina (230 mM) desestabiliza la composición. El último resultado se esperaba porque la disminución de la viscosidad de la solución, con frecuencia se relaciona con la desestabilización de las proteínas en la solución.

Este experimento muestra que el efecto desestabilizante de la reducción de la viscosidad causada por el aminoácido 60 modulador de la viscosidad arginina se elimina por completo mediante el uso de una cantidad suficiente de glicina.

Ejemplo 6 - Viscosidad de la composición de inmunoglobulinas con glicina y arginina

Para determinar si el aminoácido estabilizante glicina tiene un impacto negativo en la viscosidad de la composición de 65 inmunoglobulinas, se probaron la viscosidad dinámica de las composiciones de inmunoglobulinas con glicina 175 mM y arginina 75 mM y concentraciones crecientes de inmunoglobulinas (180 g/l, 200 g/l y 220 g/l) como se describe en

el ejemplo 3. Como comparación, también se midió la viscosidad dinámica de la composición sin aditivos y con cantidades crecientes de inmunoglobulinas. Se muestran los resultados en la figura 6. Es evidente a partir del diagrama de la figura 6 que el aminoácido estabilizante glicina no tiene un impacto negativo en la reducción de la viscosidad.

5 **Ejemplo 7 - Estabilidad de almacenamiento de varias formulaciones de inmunoglobulinas**

Los concentrados de inmunoglobulinas policlonales se prepararon como se describe en el ejemplo 1. En los siguientes experimentos de almacenamiento, se formularon y almacenaron diferentes concentrados de inmunoglobulinas. Antes y después del almacenamiento, se probó la composición de las composiciones de inmunoglobulinas.

10

Experimentos de almacenamiento con la formulación 1 de inmunoglobulinas

El concentrado de inmunoglobulinas se formuló con acetato de sodio 20 mM, NaCl 20 mM, glicina 202 mM y arginina 51 mM a una concentración de inmunoglobulinas de 208 g/l a un pH de 5,8. La viscosidad dinámica se determinó como 20,0 mPa*s. Las muestras de la composición de inmunoglobulinas se almacenaron a 2 - 8 °C o 23-27 °C durante 12 meses.

15

Las fracciones de polímeros, dímeros, monómeros, monómeros más dímeros y fragmentos se determinaron a partir de cromatogramas obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño antes y después del almacenamiento.

20

Los resultados de los almacenamientos a diferentes temperaturas se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1: Resultados del almacenamiento a una temperatura de 2 - 8 °C

Formulación 1.1	Inicial	12 meses
Polímeros	0,6	1,8
% de Dímeros	10,1	14,6
% de Monómeros	89,3	83,7
% de Mono + Dímeros	99,4	98,3
% de Fragmentos	< 0,2	< 0,2

25

Tabla 2: Resultados del almacenamiento a una temperatura de 23-27 °C

Formulación 1.2	Inicial	12 meses
Polímeros	0,6	0,6
% de Dímeros	10,1	12,4
% de Monómeros	89,3	85,2
% de Mono + Dímeros	99,4	97,6
% de Fragmentos	< 0,2	1,9

30

Experimentos de almacenamiento con la formulación 2 de inmunoglobulinas

El concentrado de inmunoglobulinas se formuló con acetato de sodio 20 mM, NaCl 20 mM, glicina 173 mM y arginina 74 mM a una concentración de inmunoglobulinas de 207 g/l a un pH de 5,8. La viscosidad dinámica se determinó como 19,1 mPa*s. Las muestras de la composición de inmunoglobulinas se almacenaron a 2 - 8 °C durante 12 meses o a 23-27 °C durante 69 meses.

35

Las fracciones de polímeros, dímeros, monómeros, monómeros más dímeros y fragmentos se determinaron a partir de cromatogramas obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño antes del almacenamiento, después de 12 meses y, en co de la composición 2.2, después de 69 meses.

40

Los resultados de los almacenamientos a diferentes temperaturas se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3: Resultados del almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C

Formulación 2.1	Inicial	12 meses	69 meses
Polímeros	0,6	1,7	2,1
% de Dímeros	9,5	14,5	16,0
% de Monómeros	89,9	83,8	81,3
% de Mono + Dímeros	99,4	98,3	97,3
% de Fragmentos	< 0,2	< 0,2	0,6

Tabla 4: Resultados del almacenamiento de la formulación 2 a una temperatura de 23-27 °C

Formulación 2.2	Inicial	12 meses
Polímeros	0,6	0,4
% de Dímeros	9,4	12,2
% de Monómeros	89,9	85,4
% de Mono + Dímeros	99,3	97,6
% de Fragmentos	< 0,2	2,0

Experimento de almacenamiento con la formulación 3 de inmunoglobulinas

5 El concentrado de inmunoglobulinas se formuló con acetato de sodio 20 mM, NaCl 20 mM, glicina 168 mM y arginina 87 mM a una concentración de inmunoglobulinas de 195 g/l a un pH de 5,7. La viscosidad dinámica se determinó como 19,1 mPa*s. Las muestras de la formulación 3 se almacenaron a 2 - 8 °C durante 67 meses.

10 Las fracciones de polímeros, dímeros, monómeros, monómeros más dímeros y fragmentos se determinaron a partir de cromatogramas obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño antes del almacenamiento, después de 12 meses, después de 24 meses y después de 69 meses de almacenamiento.

Los resultados de los almacenamientos a diferentes temperaturas se muestran en la tabla 5.

15

Tabla 5: Resultados del almacenamiento de la formulación 3 a una temperatura de 2-8 °C

Formulación 3	Inicial	12 meses	24 meses	67 meses
Polímeros	0,3	0,6	0,5	0,6
% de Dímeros	9,3	19,8	20,2	20,3
% de Monómeros	90,4	79,6	79,3	78,5
% de Mono + Dímeros	99,7	99,4	99,5	98,8
% de Fragmentos	< 0,2	< 0,2	< 0,2	0,6

Experimento de almacenamiento con la formulación 4 de inmunoglobulinas

20 El concentrado de inmunoglobulinas se formuló con acetato de sodio 20 mM, NaCl 20 mM, glicina 172 mM y arginina 70 mM a una concentración de inmunoglobulinas de 200 g/l a un pH de 5,7. La viscosidad dinámica se determinó como 19,1 mPa*s. Las muestras de la formulación 4 se almacenaron a 2 - 8 °C durante 24 meses.

25 Las fracciones de polímeros, dímeros, monómeros, monómeros más dímeros y fragmentos se determinaron a partir de cromatogramas obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño antes del almacenamiento, después de 12 meses y después de 24 meses de almacenamiento.

Los resultados de los almacenamientos a diferentes temperaturas se muestran en la tabla 6.

30

Tabla 6: Resultados del almacenamiento de la formulación 4 a una temperatura de 2-8 °C

Formulación 4	Inicial	12 meses	24 meses
Polímeros	0,4	0,7	0,6
% de Dímeros	10,1	20,5	20,0
% de Monómeros	89,5	78,8	79,4
% de Mono + Dímeros	99,6	99,3	99,4
% de Fragmentos	< 0,2	< 0,2	< 0,2

Experimento de almacenamiento con la formulación 5 de inmunoglobulinas

35 El concentrado de inmunoglobulinas se formuló con acetato de sodio 20 mM, NaCl 20 mM, glicina 172 mM y arginina 77 mM a una concentración de inmunoglobulinas de 200 g/l a un pH de 5,7. La viscosidad dinámica se determinó como 19,1 mPa*s. Las muestras de la formulación 5 se almacenaron a 2 - 8 °C durante 12 meses.

40 Las fracciones de polímeros, dímeros, monómeros, monómeros más dímeros y fragmentos se determinaron a partir de cromatogramas obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño antes del almacenamiento y después de 12 meses de almacenamiento.

Los resultados de los almacenamientos a diferentes temperaturas se muestran en la tabla 7.

Tabla 7: Resultados del almacenamiento de la formulación 5 a una temperatura de 2-8 °C

Formulación 5	Inicial	12 meses
Polímeros	0,3	0,6
% de Dímeros	9,8	19,7
% de Monómeros	89,9	79,6
% de Mono + Dímeros	99,7	99,4
% de Fragmentos	< 0,2	< 0,2

Experimentos de almacenamiento con la formulación 6 de inmunoglobulinas

5 El concentrado de inmunoglobulinas se formuló con acetato de sodio 20 mM, NaCl 20 mM, glicina 150 mM y arginina 100 mM a una concentración de inmunoglobulinas de 210 g/l a un pH de 5,7. La viscosidad dinámica se determinó como 18,1 mPa*s. Las muestras de la formulación 6 se almacenaron a 2 - 8 °C o 23-27 °C durante 12 meses.

10 Las fracciones de polímeros, dímeros, monómeros, monómeros más dímeros y fragmentos se determinaron a partir de cromatogramas obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño antes del almacenamiento y después de 12 meses de almacenamiento.

Los resultados de los almacenamientos a diferentes temperaturas se muestran en las tablas 8 y 9.

15

Tabla 8: Resultados del almacenamiento de la formulación 6 a una temperatura de 2-8 °C

Formulación 6,1	Inicial	12 meses
Polímeros	0,6	1,4
% de Dímeros	10,1	13,9
% de Monómeros	89,3	84,7
% de Mono + Dímeros	99,4	98,6
% de Fragmentos	< 0,2	< 0,2

Tabla 9: Resultados del almacenamiento de la formulación 6 a una temperatura de 23-27 °C

20

Formulación 6,2	Inicial	12 meses
Polímeros	0,6	0,4
% de Dímeros	10,1	11,2
% de Monómeros	89,3	86,2
% de Mono + Dímeros	99,4	97,4
% de Fragmentos	< 0,2	2,1

Experimentos de almacenamiento con la formulación 7 de inmunoglobulinas

25 El concentrado de inmunoglobulinas se formuló con acetato de sodio 20 mM, NaCl 20 mM, glicina 196 mM y arginina 51 mM a una concentración de inmunoglobulinas de 184 g/l a un pH de 5,7. La viscosidad dinámica se determinó como 12,2 mPa*s. Las muestras de la formulación 7 se almacenaron a 2 - 8 °C o 23-27 °C durante 12 meses.

30 Las fracciones de polímeros, dímeros, monómeros, monómeros más dímeros y fragmentos se determinaron a partir de cromatogramas obtenidos por cromatografía de exclusión por tamaño antes del almacenamiento y después de 12 meses de almacenamiento.

Los resultados de los almacenamientos a diferentes temperaturas se muestran en las tablas 10 y 11.

Tabla 10: Resultados del almacenamiento de la formulación 7 a una temperatura de 2-8 °C

35

Formulación 7,1	Inicial	12 meses
Polímeros	0,6	1,7
% de Dímeros	7,2	14,9
% de Monómeros	92,2	83,4
% de Mono + Dímeros	99,4	98,3
% de Fragmentos	< 0,2	< 0,2

Tabla 11: Resultados del almacenamiento de la formulación 7 a una temperatura de 23-27 °C

Formulación 7,2	Inicial	12 meses
Polímeros	0,6	0,6
% de Dímeros	7,2	12,4
% de Monómeros	92,2	85,2
% de Mono + Dímeros	99,4	97,7
% de Fragmentos	< 0,2	1,9

REFERENCIAS

- 5 Bolli R, Woodtli K, Bärtschi M, Höfferer L, Lerch P. L-Proline reduces IgG dimer content and enhances the stability of intravenous immunoglobulin (IVIg) solutions; *Biologicals*. 2010;38(1):150-157.
- 10 Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res*. Springer; 2003;20(9): 1325-36.
- McCue JP, Hein RH, Tenold R. Three generations of immunoglobulin G preparations for clinical use; *Rev Infect Dis*. 1986;8 Suppl 4: S374-81.
- 15 Mueller M, Loh MQT, Tee DHY, Yang Y, Jungbauer A. Liquid formulations for longterm storage of monoclonal IgGs; *Appl Biochem Biotechnol*. 2013; 169:1431-48.
- Szenczi Á, Kardos J, Medgyesi G a., Závodszy P - The effect of solvent environment on the conformation and stability of human polyclonal IgG in solution. *Biologicals*. 2006; 34:5-14.
- 20 Trevino SR, Scholtz JM, Pace CN. Measuring and Increasing Protein Solubility; 2008;97(10):4155-66 Wang W, Roberts CJ, editors. *Aggregation of Therapeutic Proteins*; John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, Nueva Jersey; 2013. 325-356.
- Vermeer AWP, Norde W. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein; *Biophys J*; enero de 2000;78(1):394-404.
- 25 Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody structure, instability, and formulation; *J Pharm Sci*. 2007;96(1):1-26.
- 30 Weiss I V, William F, Young TM, Roberts CJ. Principles, approaches, and challenges for predicting protein aggregation rates and shelf life; *J Pharm Sci*.; 2009;98(4): 1246-77.

REIVINDICACIONES

1. Una composición líquida que comprende inmunoglobulinas policlonales, al menos un aminoácido modulador de la viscosidad, seleccionado de arginina e histidina, y al menos un aminoácido estabilizante, seleccionado de glicina y prolina, en donde más del 90 % de las inmunoglobulinas policlonales están en forma de monómeros o dímeros y menos del 5 % en forma de polímeros, y en donde la concentración de inmunoglobulinas en la composición es superior a 160 g/l y el pH está en el intervalo de 5,5 a 5,9.
2. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la concentración de inmunoglobulinas está en el intervalo de más de 160 a 300 g/l, en particular, en el intervalo de más de 160 a 260 g/l.
3. La composición líquida de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el pH está en el intervalo de 5,6 a 5,8.
4. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por**
- una concentración de inmunoglobulinas en el intervalo de más de 160 a 180 g/l y una viscosidad dinámica en el intervalo de > 5 a ≤ 12 mPa*s;
 - una concentración de inmunoglobulinas en el intervalo de más de 180 a 220 g/l y una viscosidad dinámica de > 12 a ≤ 35 mPa*s; o
 - una concentración de inmunoglobulinas en el intervalo de más de 220 a 260 g/l y una viscosidad dinámica de > 35 a ≤ 100 mPa*s, en donde la viscosidad dinámica se determina con el Microviscosímetro automatizado "AMVn" de Anton Paar® GmbH a una temperatura de +20,0 °C y un ángulo de inclinación capilar de 50°.
5. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la concentración total del (de los) aminoácido(s) estabilizante(s) y del (de los) aminoácido(s) modulado(res) de la viscosidad está en el intervalo de 100 a 400 mM, preferentemente en el intervalo de 150 a 350 mM, más preferentemente en el intervalo del 200-300 mM, en particular, en el intervalo de 225 a 275 mM.
6. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde
- el aminoácido estabilizante es glicina y el aminoácido modulador de la viscosidad es arginina o histidina; o
 - el aminoácido estabilizante es prolina y el aminoácido modulador de la viscosidad es arginina o histidina; o
 - el aminoácido estabilizante es glicina o prolina y los aminoácidos moduladores de la viscosidad son arginina e histidina; o
 - los aminoácidos estabilizantes son glicina y prolina y el aminoácido modulador de la viscosidad es arginina o histidina; o
 - los aminoácidos estabilizantes son glicina y prolina y los aminoácidos moduladores de la viscosidad son arginina e histidina.
7. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la concentración del (de los) aminoácido(s) estabilizante(s) está en el intervalo de 130 a 220 mM, preferentemente en el intervalo de 150 a 200 mM, preferentemente en el intervalo de 160 a 190 mM, en particular, en el intervalo de 170 a 180 mM.
8. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la concentración del (de los) aminoácido(s) modulador(es) de la viscosidad está en el intervalo de 50 a 100 mM, preferentemente en el intervalo de 60 a 90 mM, preferentemente en el intervalo de 65 a 85 mM, en particular, en el intervalo de 70-80 mM.
9. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la concentración de prolina está en el intervalo de 140 a 160 mM y la concentración de arginina está en el intervalo de 70 a 100 mM.
10. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la preparación tiene una estabilidad de almacenamiento de al menos 40 meses, preferentemente de al menos 60 meses de 2 a 8 °C, más preferentemente de al menos 69 meses.
11. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la composición contiene acetato de sodio, preferentemente en el intervalo de 10 a 30 mM, más preferentemente aproximadamente 20 mM y/o cloruro de sodio, preferentemente en el intervalo de 10 a 30 mM, más preferentemente aproximadamente 20 mM.
12. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que contiene uno o más excipientes seleccionados de tensioactivo, detergente o sacárido o una combinación de los mismos.
13. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la composición tiene títulos de hemaglutininas de ≤ 16 para anti-A y ≤ 8 para anti-B cuando se determinan mediante la Prueba de Coombs Directa.
14. La composición líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la composición es una

ES 2 770 674 T3

composición de inmunoglobulina G con un contenido de inmunoglobulina G de 185 a 215 g/l, un valor de pH de 5,5 a 5,9 y una viscosidad dinámica de > 12 hasta 30 mPa*s, cuando se formula con glicina 150 a 210 mM y arginina 50-105 mM, en donde la viscosidad dinámica se determina con el Microviscosímetro automatizado "AMVn" de Anton Paar® GmbH a una temperatura de +20,0 °C y un ángulo de inclinación capilar de 50°.

- 5
15. Una composición líquida para su uso en tratamiento médico, en donde la composición líquida se define de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y en donde el tratamiento comprende administrar la composición líquida a un paciente mediante inyección intramuscular o inyección subcutánea.
- 10
16. Un método para formular una composición de inmunoglobulinas policlonales con una concentración de inmunoglobulinas superior a 160 g/l, que comprende las etapas de:
- proporcionar una composición de inmunoglobulinas policlonales con una concentración de inmunoglobulinas superior a 160 g/l,
- 15
- ajustar el pH de la composición a un valor en el intervalo de 5,5 a 5,9,
 - añadir, al menos, un aminoácido estabilizante, seleccionado de glicina y prolina y
 - añadir, al menos, un aminoácido modulador de la viscosidad, seleccionado de arginina e histidina.

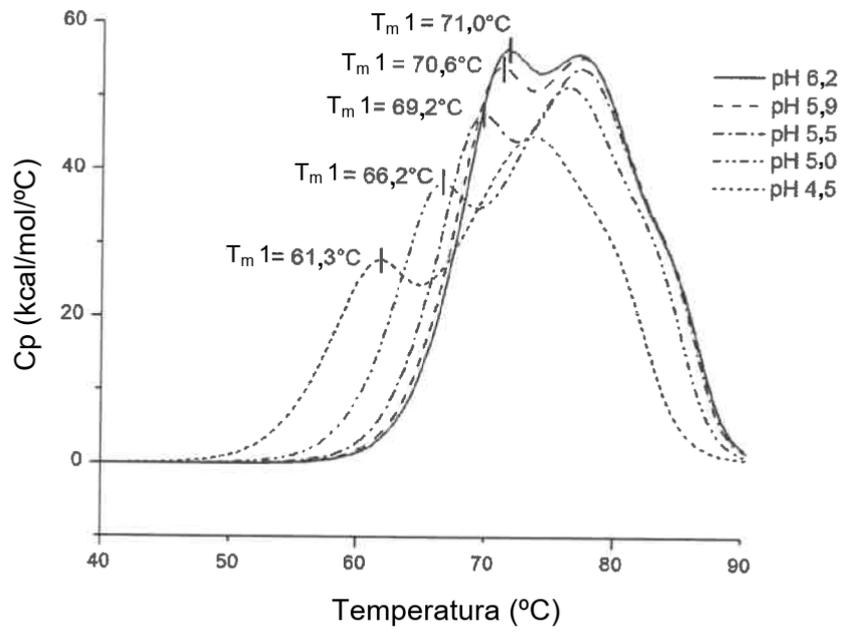


Fig. 1

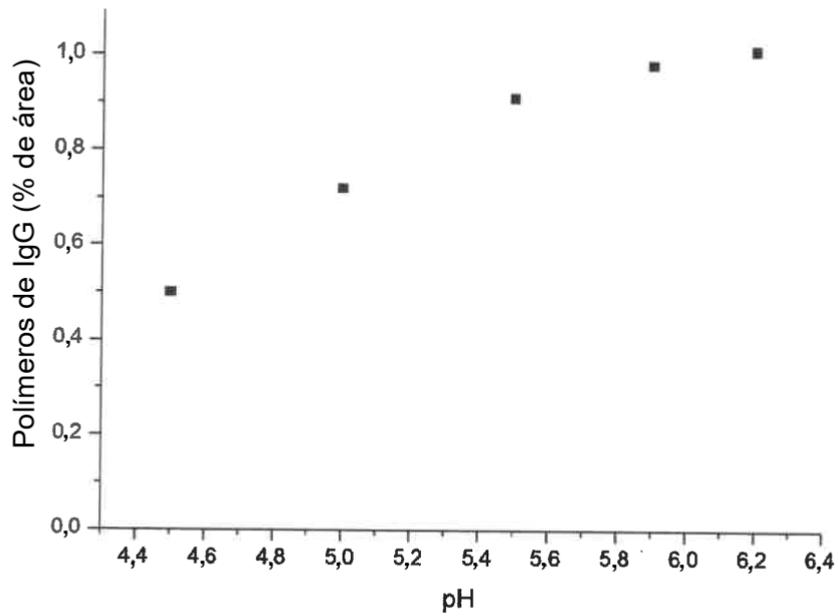


Fig. 2

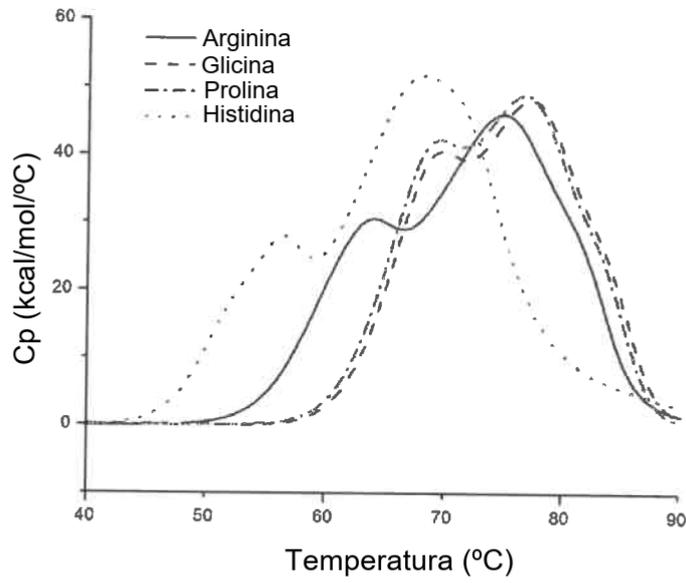


Fig. 3

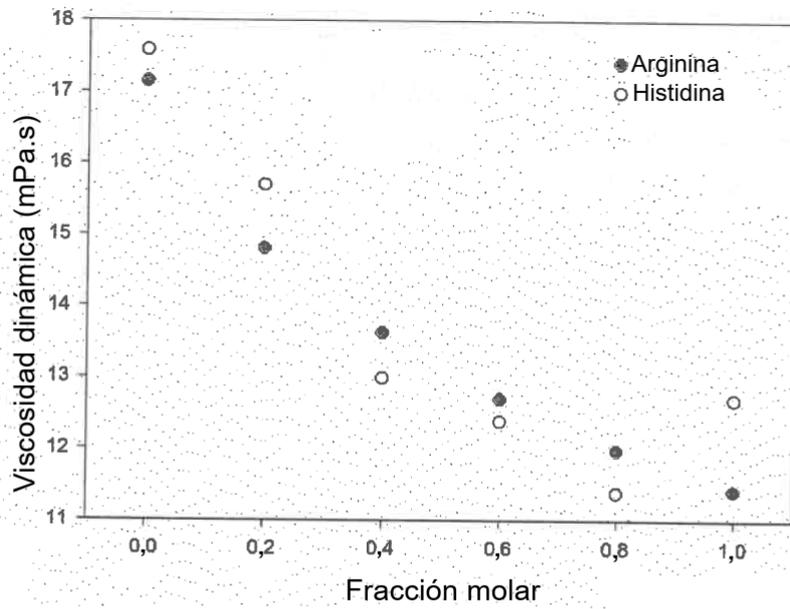


Fig. 4

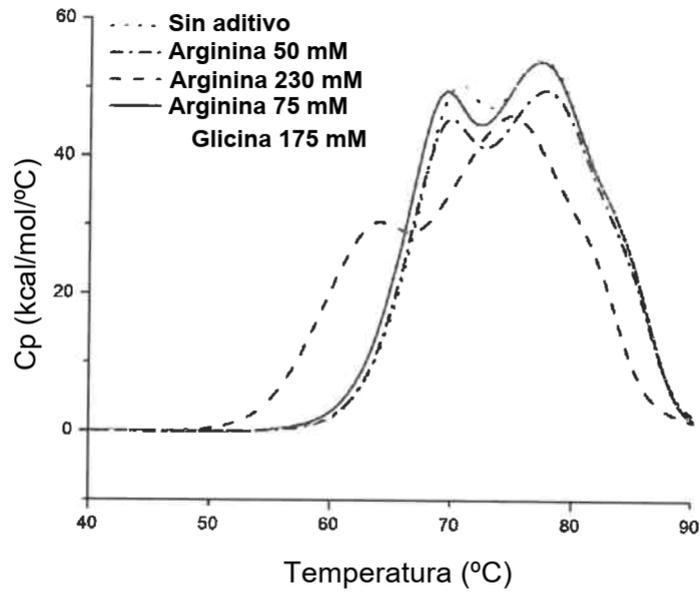


Fig. 5

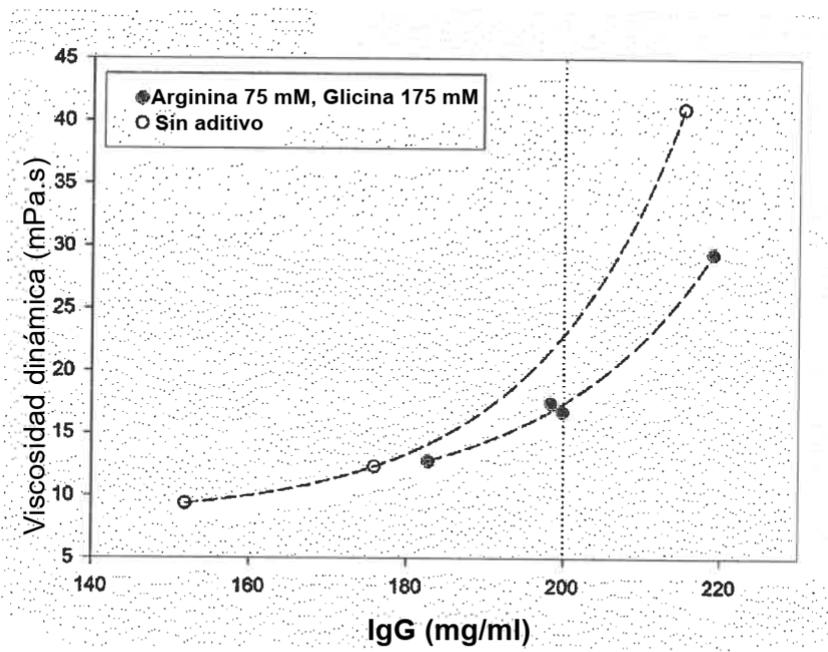


Fig. 6