

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
8 juillet 2010 (08.07.2010)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/076537 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 39/395 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/052714

(22) Date de dépôt international :
29 décembre 2009 (29.12.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0859117 30 décembre 2008 (30.12.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES
BIOTECHNOLOGIES [FR/FR]; 3 Avenue Des
Tropiques, ZA de Courtaboeuf, F-91940 Les Ulis (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BARDAT,
Annie [FR/FR]; 3 allée des Diziaux, F-91470 Limours
(FR). BEGIN, Edith [FR/FR]; 7 Résidence de la
Vaucouleur, F-91940 Les Ulis (FR).

(74) Mandataires : CHAJMOWICZ, Marion et al.; Becker
& Associates, 25 rue Louis Le Grand, F-75 002 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasienn (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
requises (règle 48.2.h))

(54) Title : IMMUNOGLOBULIN G COMPOSITION

(54) Titre : COMPOSITION D'IMMUNOGLOBULINES G

(57) Abstract : The invention relates to an immunoglobulin G composition including mannitol, glycine and a nonionic detergent, with an immunoglobulin G concentration of 100 g/l ± 20 g/l.

(57) Abrégé : L'invention concerne une composition d'immunoglobulines G comprenant du mannitol, de la glycine et un détergent non ionique, dans laquelle la concentration en immunoglobulines G est de 100 g/l ± 20g/l.



WO 2010/076537 A1

Composition d'immunoglobulines G

L'invention concerne une composition d'immunoglobulines G comprenant du mannitol, de la glycine et un détergent non ionique.

De nombreuses pathologies sont actuellement traitées par des compositions d'immunoglobulines G (IgG). On peut citer par exemple les déficits immunitaires primitifs avec défaut de production d'anticorps, la maladie de Kawasaki, le purpura thrombopénique immunologique de l'enfant et de l'adulte, les déficits immunitaires secondaires avec défaut de production d'anticorps, en particulier la leucémie lymphoïde chronique ou myélome associés à des infections à répétition, l'infection de l'enfant par le VIH associée à des infections bactériennes, les neuropathies motrices multifocales, le syndrome de Guillain-Barré, les infections aiguës sévères ou chroniques à Parvovirus B19, l'immunodéficience acquise ou constitutionnelle, la dermatomyosite cortico-résistante, la myasthénie aiguë, la polyradiculonévrite chronique idiopathique, le purpura thrombopénique immunologique, par exemple associé à l'infection par le VIH, le syndrome de l'homme raide (Stiffman syndrome), la neutropénie auto-immune, l'érythroblastopénie auto-immune résistante, le syndrome d'anti-coagulation acquise par auto-anticorps, la polyarthrite rhumatoïde, etc.

Au cours de ces dernières années, la très forte demande d'IgG a engendré des situations de tension extrêmes sur les approvisionnements, pouvant aller jusqu'à des situations de pénurie en Europe et aux Etats Unis d'Amérique.

Dans ce contexte, il y a un besoin grandissant de produire des compositions d'IgG, habituellement conditionnées à des pH acides et injectables par voie intraveineuse, à partir par exemple de plasmas humains. Avec l'essor de ces besoins en IgG, la stabilisation de ces compositions d'IgG injectables par voie intraveineuse (IgGIV) en vue de leur utilisation thérapeutique et de leur conservation revêt un caractère fondamental.

A cet égard, on sait qu'il est nécessaire de stabiliser les IgGIV pour éviter notamment la formation d'agrégats (oligomères et polymères) susceptibles d'activer le système du complément avec des risques associés de réactions

anaphylactiques. Par ailleurs, la présence de dimères dans les IgGIV a été corrélée à des baisses de pression artérielle in vivo (Bleeker W.K. et al, Blood, 95, 2 000, p. 6-18 6 1). D'autres dégradations physicochimiques peuvent également intervenir au cours de la conservation des IgG comme, entre autres, l'oxydation et
5 l'hydrolyse.

La stabilisation des IgG nécessite donc l'ajout de composés, classiquement choisis parmi les sucres et les acides aminés, afin d'obtenir non seulement des compositions d'IgG non dégradées appropriées à un usage thérapeutique mais également des compositions d'IgG présentant une stabilité accrue durant le
10 stockage.

La stabilisation des formes lyophilisées de compositions protéiniques et notamment d'IgG, par l'ajout de stabilisants spécifiques, a fait l'objet de très nombreuses études.

Celles citées dans les publications scientifiques de M. Pikal, "Freeze-Drying of
15 Proteins, Part 2 : Formulation Selection", Biopharm. 3(9); pp.26-30 (1990) et de Arakawa et al, Pharm. Res., 1991, 8(3), p. 285-291, montrent que l'ajout d'un excipient dans des compositions protéiniques avant lyophilisation, augmente la stabilité au cours de la lyophilisation et/ou la stabilité du produit lyophilisé lors du stockage. Parmi ces stabilisants, certains sont toutefois connus comme étant des
20 agents précipitants de protéines supérieures à environ 100 kDa. Ainsi, l'utilisation de polyéthylène glycol (PEG) 3000-6000 est rédhibitoire dans la phase de congélation en vue de la lyophilisation de compositions protéiniques correspondantes. Osterberg et al (Pharm. Res., 1997, 14(7), p. 892-892) ont montré l'efficacité d'un mélange d'histidine, de saccharose, d'un tensioactif non
25 ionique et de chlorure de sodium pour la stabilisation des formes lyophilisées du facteur VIII recombinant et l'ajout de PEG n'en a pas amélioré la stabilité. En outre, Guo et al (Biomacromol., 2002, 3(4), p. 846-849) précisent que la lyophilisation de la peroxydase de raifort en présence de PEG, ne permet pas d'en conserver la structure native. La présence de PEG ne paraît donc pas
30 souhaitable.

Des compositions d'IgGIV lyophilisées sont disponibles dans le commerce, par exemple sous les noms de marques Polygam™ (American Red Cross), Gammar IV™ (Armour Pharmaceutical Company) et Venoglobulin™I (Alpha) contenant comme stabilisants du glucose à 2%, du saccharose à 5% et du D-mannitol à 2%
5 respectivement.

La demande de brevet international WO 97/04801 décrit l'effet de stabilisation de formulations d'anticorps monoclonaux lyophilisés (de type immunoglobulines G et E) comprenant des excipients spécifiques. Parmi ces excipients, la combinaison glycine/mannitol n'est pas retenue pour défaut d'efficacité au regard d'autres
10 combinaisons telles que saccharose/glycine et saccharose/mannitol.

On constate, toutefois, que des stabilisants appropriés aux formes lyophilisées des IgGIV peuvent être totalement inefficaces pour des compositions d'IgGIV liquides.

Ainsi, les compositions d'IgGIV liquides, disponibles dans le commerce, comprennent des stabilisants spécifiques différents de ceux utilisés pour la forme lyophilisée correspondante. A titre d'exemple, les compositions liquides d'IgGIV qui contiennent comme stabilisants du maltose à 10%, de la glycine de 0,16 à 0,24 M et du D-sorbitol à 5% sont respectivement connues sous les noms de
15 marque Octagam™, (Octapharma), Gamunex™ 10% (Talecris) et Venoglobulin™ (Alpha).
20

La nature différente des composés utilisés pour la stabilisation des compositions d'IgG sous forme liquide et sous forme lyophilisée, a amené certains auteurs à rechercher des stabilisants ou mélanges de stabilisants identiques permettant de conserver les compositions d'IgG sous les deux formes à la fois. A cet égard, des
25 études récentes ont porté sur la stabilisation de compositions d'IgGIV, Vigam-S et Vigam Liquid (noms de marques de National Blood Authority, Angleterre) liquides et après lyophilisation (Vigam-S) comprenant un mélange identique de stabilisants à savoir l'albumine et le saccharose (K. Chidick et al, Vox Sanguinis, 77, 204-209, 1999). Toutefois, la solution Vigam Liquid est conditionnée à un pH acide (pH 5)
30 ce qui présente l'inconvénient de transformer, par hydrolyse, le saccharose en

sucre réducteurs (fructose et glucose) qui se condensent avec les résidus aminés de la lysine des IgG et de l'albumine pour donner une base de Schiff instable évoluant en des produits de Maillard (brunissement de la solution). Il n'est bien entendu pas satisfaisant d'utiliser des excipients qui évoluent au cours de la
5 conservation des IgG car la maîtrise de la réaction n'est pas possible, une fois celle-ci initiée.

Par ailleurs, certains des stabilisants cités précédemment, comme le maltose ou le saccharose, ne peuvent être utilisés sans risques chez des sujets présentant des insuffisances rénales et/ou souffrant de diabète.

10 Afin de palier les inconvénients précédents, la Demanderesse a mis au point une formulation stabilisante unique, qui assure la stabilisation à la fois des formes liquides et lyophilisées des IgG. Une formulation particulièrement efficace pour stabiliser les compositions d'immunoglobulines est décrite dans la demande de brevet internationale WO 2004/091656 déposée par la Demanderesse. Cette
15 demande de brevet divulgue une composition contenant 50 g/l d'IgG, 50 g/l de mannitol, 10 g/l de glycine et 50 ppm de détergent, 50 ppm de détergent correspond à une concentration de 50 mg/l de détergent.

Comme pour de nombreux médicaments injectables, les excipients des compositions d'IgIV peuvent induire des effets secondaires indésirables plus ou
20 moins importants. Ces effets secondaires sont souvent dus aux excipients eux-mêmes qui peuvent être responsables, par exemple, de réactions allergiques. A titre d'exemple, lorsqu'on administre 300 mL d'un concentré d'IgIV de la composition décrite dans la demande WO 2004/091656, la quantité d'excipient administrée au patient sera de 15 g de mannitol, 3 g de glycine et 15 mg de
25 détergent.

Par ailleurs, il est connu que lorsque l'on augmente la concentration en immunoglobuline d'une composition d'IgG, il peut se former des oligomères et polymères dans ladite composition. Les oligomères et polymères sont susceptibles d'activer le système du complément avec des risques associés de
30 réactions anaphylactiques. Ces oligomères et polymères sont également

susceptibles d'induire des hypotensions chez le patient traité. Ceci n'est pas souhaitable et strictement contrôlé du point de vue réglementaire. Pour éviter l'apparition d'oligomères et polymères lorsque l'on augmente la concentration en immunoglobuline d'une composition d'IgG, il faut généralement augmenter également la concentration en excipients. Cette augmentation de la concentration en excipients permet de stabiliser la composition d'IgG. En effet les excipients ont une fonction stabilisante et leur quantité est généralement corrélée à la quantité de principe actif, notamment lorsque le principe actif est une immunoglobuline.

Partant de la composition stable décrite dans WO 2004/091656 contenant 50g/l d'IgG, 50 g/l de mannitol, 10 g/l de glycine et 50 ppm de détergent, la Demanderesse s'est aperçu de manière surprenante que :

- (i) non seulement il était possible d'obtenir une composition stable d'IgG à une concentration de 100 g/l \pm 20 g/l d'IgG tout en conservant les mêmes excipients et sans augmenter la concentration desdits excipients ;
- (ii) mais en plus, qu'il était possible d'obtenir une composition stable d'IgG à une concentration de 100 g/l \pm 20 g/l en diminuant la concentration d'au moins un des excipients (glycine, mannitol ou détergent).

Ainsi la composition stable mise au point par la Demanderesse présente deux avantages majeurs par rapport à la composition déjà décrite dans WO 2004/091656 :

- Premièrement, le fait d'avoir une plus grande concentration en IgG, c'est-à-dire une plus grande quantité de principe actif pour un même volume, permet d'administrer aux patients un volume moindre de ladite composition. Le temps d'administration est donc significativement réduit, ce qui se traduit par moins de contrainte pour les patients traités.
- Deuxièmement, le fait d'administrer un volume moindre de ladite composition sans augmenter la concentration desdits excipients, de préférence en diminuant la concentration d'au moins un desdits excipients, se traduit par une diminution importante de la quantité d'excipients administrée au patient.

Par conséquent, pour une même quantité d'IgG, le volume d'une composition de concentration en IgG de 100 g/l sera deux fois moins important que le volume d'une composition de concentration en IgG de 50 g/l. Il en résulte qu'à concentration en excipients identique, la quantité d'excipients administrée avec la composition de concentration en IgG de 100 g/l sera deux fois moins importante que la quantité d'excipients administrée avec la composition de concentration en IgG de 50 g/l. Le risque d'induire des effets secondaires liés aux excipients est donc significativement réduit.

L'invention concerne une composition d'immunoglobulines G comprenant du mannitol, de la glycine et un détergent non ionique caractérisée en ce que la concentration en immunoglobulines G est de 100 g/l \pm 20 g/l.

Dans la suite de la description, la composition selon l'invention comprenant 100 g/l \pm 20 g/l d'immunoglobulines G peut également être appelée « composition d'IgG 10% »

La composition selon l'invention est caractérisée par une concentration en immunoglobulines G de 100 g/L \pm 20 g/l, c'est-à-dire que la composition selon l'invention peut présenter une concentration en immunoglobulines G comprise entre 80 g/l et 120 g/l. Avantageusement la composition selon l'invention présente une concentration en immunoglobulines G de 100 g/l \pm 10 g/l, de préférence 100 g/l \pm 5 g/l, de préférence 100 g/l.

La glycine, anciennement appelée glycofolle ou acide aminoacétique est le plus simple des acides aminés. De préférence, la concentration en glycine de la composition selon l'invention est comprise entre 4 g/l et 10 g/l.

Le mannitol ou 1,2,3,4,5,6-hexanehexol ($C_6H_{14}O_6$) est un polyol ou « sucre-alcool » similaire au xylitol ou au sorbitol. Le mannitol a été choisi par la Demanderesse sur des critères de stabilité à des pH acides de conditionnement des compositions d'IgG, ce qui évite des réactions de Maillard sur les immunoglobulines G, sur des critères de compatibilité pharmaceutique et sur des critères relatifs à leur action stabilisante des compositions d'immunoglobulines sous forme liquide. La concentration en mannitol suffisante pour stabiliser la composition selon l'invention

est inférieure ou égale à 50 g/l. De préférence, la concentration en mannitol de la composition selon l'invention est comprise entre 20 g/l et 50 g/l. Toutes les formes du mannitol peuvent être utilisées.

Un détergent non-ionique approprié utilisé dans la composition selon l'invention est avantageusement choisi parmi le Tween®80 ou polysorbate 80 (polyoxyéthylènesorbitanne-monooléate), le Tween®20 (polyoxyéthylènesorbitanne-monolaurate), le Triton® X 100 (octoxinol 10) et le Pluronic®F68 (polyéthylène-polypropylène glycol). De préférence, le Tween®80 ou le Triton® X100 sont utilisés. Les détergents non ioniques peuvent également être combinés entre eux. De préférence, le détergent est présent à une concentration comprise entre 20 et 100 mg/l, de préférence entre 30 et 60 mg/l, de préférence entre 40 et 60 mg/l et de préférence entre 40 et 50 mg/l. De préférence le détergent est le polyoxyéthylènesorbitanne-monooléate (polysorbate 80).

Dans un mode de réalisation préféré, on utilise entre 30 et 60, de préférence entre 40 et 50mg/l de polysorbate 80, de préférence 50mg/l.

Dans un mode de réalisation préféré, la composition de l'invention comprend, ou est de préférence constituée de :

- 100 g/l d'IgG
- 32 g/l de mannitol
- 20 - 7 g/l de glycine
- 50 mg/l de polyoxyéthylènesorbitanne-monooléate (polysorbate 80).

De préférence la composition de l'invention présente un pH de $4,6 \pm 0,2$.

La composition d'IgG 10% selon l'invention peut comprendre, outre le mannitol, la glycine et un détergent non ionique, au moins un autre additif. Cet additif peut aussi bien représenter un composé choisi parmi les différentes catégories de stabilisants classiquement utilisés dans le domaine technique de l'invention, tels que les tensioactifs, les sucres et les acides aminés, qu'un excipient ajouté à la

formulation afin d'en ajuster, par exemple, le pH, la force ionique etc. Alternativement, la composition d'IgG 10% selon l'invention ne comprend pas d'autres excipients que lesdits mannitol, glycine et détergent non ionique. Une telle composition d'IgG 10% exclusivement constituée de ces trois composés
5 selon l'invention, présente l'avantage d'offrir une bonne stabilisation des compositions d'IgG 10% et une réduction des durées et des coûts de préparation à l'échelle industrielle grâce à la présence d'un nombre minimal efficace d'excipients ainsi que la présence d'une quantité minimale efficace d'excipients.

La composition selon l'invention est avantageusement sous forme liquide.

10 Dans le cadre de l'invention, les compositions d'IgG liquides signifient des solutions aqueuses de compositions d'IgG polyclonales, directement obtenues par fractionnement du plasma humain, Le milieu aqueux représente de l'eau pour préparation injectable (eau PPI) pouvant contenir des excipients pharmaceutiquement acceptables et compatibles avec les IgG. Les compositions
15 d'IgG peuvent au préalable subir des étapes spécifiques d'inactivation/élimination de virus, tel qu'un traitement solvant détergent, une pasteurisation et/ou une nanofiltration. La composition selon l'invention comprend des IgG qui peuvent être polyclonales ou monoclonales. Les IgG peuvent être isolées à partir du sang humain ou animal ou produites par d'autres moyens, par exemple par des
20 techniques de biologie moléculaire, par exemple dans des systèmes cellulaires bien connus de l'homme du métier. La composition selon l'invention est particulièrement adaptée aux IgG hautement purifiées. Avantageusement, les IgG de la présente invention sont obtenues par fractionnement du plasma humain. Des méthodes de fractionnement préférées du plasma humain sont décrites par Cohn
25 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. et Biol., XIV, 1054, 1969) et dans la demande de brevet WO 94/9334, ces documents sont incorporés par référence dans leur globalité. Une méthode de préparation d'une composition d'immunoglobulines G est également décrite dans la demande de brevet WO
30 02/092632, incorporée par référence dans sa globalité.

La composition d'IgG 10% de l'invention sous forme liquide et/ou sous forme lyophilisée peut en outre être à usage thérapeutique et notamment injectable par voie intraveineuse, parentérale ou sous-cutanée. La composition d'IgG 10% de l'invention, sous forme liquide après un stockage durant une période de 6 mois à 5°C ou à 25°C présente un taux de polymères bien en deçà des normes fixées par la Pharmacopée Européenne (3%), avantageusement inférieur à environ 0,3%.

La composition de l'invention peut être une composition pharmaceutique, c'est-à-dire adaptée à un usage thérapeutique.

Les exemples et figures suivants illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

LEGENDE DES FIGURES :

La figure 1 est un graphe représentant la mesure de la turbidité sur les compositions testées stressées et non stressées.

La figure 2 est un graphe représentant le pourcentage d'activité anti-HBs des lots durant les 6 mois de stabilité aux 2 températures de stockage par rapport à T0.

La figure 3 est un graphe représentant l'activité anti-complémentaire des solutions après stress d'agitation ou sans stress (NS) en fonction de la dose de détergent ajoutée.

EXEMPLES :

20 **Exemple I: Préparation des compositions d'IgG 10% à tester**

Une composition d'IgG a été obtenue selon la méthode développée par la Demanderesse dans la demande de brevet internationale WO 2007/077365 ou WO 02/092632. Cette composition, contenant environ 100 g/l d'IgG (IgG 10%), est ajustée à un pH compris entre 4,6 et 4,8.

25 A cette composition d'IgG 10%, on ajoute le mannitol, la glycine et le Polysorbate 80 seuls ou en mélange dans les concentrations précisées au Tableau 1.

Tableau 1: Caractéristiques des solutions test

Composition en excipients	Composition F1	Composition F2	Composition F3
IgG (g/l)	100	100	100
Glycine (g/l)	22,5	7	7
Mannitol (g/l)	0	32	32
Polysorbate 80 (g/l)	0	0	40
pH final	4,6 ± 0,1	4,6 ± 0,1	4,6 ± 0,1

Exemple 2 : Stress appliqués aux compositions

Les compositions de l'exemple 1 (F1, F2 et F3) sont ensuite soumises à différents essais de stress thermique, d'agitation et d'oxydation.

Le stress thermique est effectué selon la publication de P. Fernandes et al, Vox Sanguinis, 1980,39, p. 101-112. En résumé, des échantillons de 5 ml de solution test sont placés dans des flacons en verre sertis de 10 ml et sont ensuite chauffés au bain-marie à 60°C pendant 2 heures.

Le stress d'agitation est effectué comme décrit dans la publication de H. Levine et al, Journal of Parental Science & technology, 1991, vol. 45, n°3, p. 160 165. Ainsi, on place des échantillons de 5 ml de solution test dans des flacons en verre sertis de 10 ml protégés de la lumière, puis chaque flacon est mis en position couchée sur un agitateur IKA Vibrax XR (provenant de chez Fisher Scientific, France), et est ensuite agité à 500 tours par minute pendant 18 heures à température ambiante.

Le stress d'oxydation est réalisé sur des échantillons de 10 ml de solution test placés dans des flacons en verre de 30 ml. On ajout du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans chaque échantillon de manière à obtenir une concentration finale en

[H₂O₂] égale à 9 mM. Après bouchage et homogénéisation des flacons, ceux-ci sont incubés 1h à 25°C.

Exemple 3 : mesure de la turbidité

- 5 Chacune des compositions de l'exemple 1 (F1, F2 et F3) est soumise ou non à un stress tel que défini à l'exemple 2. Une mesure de la turbidité est réalisée sur chaque échantillon. Plus les valeurs de turbidité mesurées sont faibles, plus les solutions d'IgG sont stables face au stress appliqué.

10 Les différents résultats de mesure obtenus après l'application des différents stress précédents, sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2

Turbidité (NTU*)				
Solution test	Avant stress	Après stress d'agitation	Après stress thermique	Après stress d'oxydation
F1	3,0	11,9	16,2	4,1
F2	2,8	12,4	13,8	4,5
F3	2,7	2,7	9,5	2,7

*NTU : Normalized Turbidity Units

15 Les résultats montrent que la turbidité de la composition F3 est la seule à ne pas évoluer après les stress d'agitation et d'oxydation. C'est aussi la valeur la moins élevée après le stress thermique (Figure 1).

Exemple 4 : Mesure de l'activité anti complémentaire (AAC) (Méthode 2.6.17 de la pharmacopée européenne)

Les compositions F1, F2 et F3, stressées ou pas, sont soumises au test d'AAC (Méthode 2.6.17 de la pharmacopée européenne) avant et après chaque stress tel que décrit dans l'exemple 2. Ce test décrit l'aptitude des immunoglobulines à activer le système du complément, une activation trop puissante du complément pouvant nuire à la tolérance du produit lors de son injection. Les solutions oxydées n'ont pas été données à analyser, la présence d'eau oxygénée perturbant le dosage.

Le tableau 3 présente les l'AAC des solutions avant et après stress.

Tableau 3

AAC (%)			
Solution test	Avant stress	Après stress d'agitation	Après stress thermique
F1	80	100	52
F2	61	100	51
F3	42	43	51

Seule la formulation F3 est conforme à la norme de la Pharmacopée européenne au départ et après agitation. Les formulations F1 et F2 ont une AAC non conforme dans tous les cas étudiés.

Exemple 5 : aspect visuel

Chacune des compositions de l'exemple 1 (F1, F2 et F3) sont soumises ou non à un stress tel que défini à l'exemple 2. On observe ensuite au travers d'une mireuse pharmacopée (Méthode 2.9.20 de la pharmacopée européenne) l'aspect visuel de chacun des échantillons. L'aspect visuel permet de détecter la présence de particules de grandes tailles dans la composition. L'apparition de telles particules traduit une dénaturation de la solution protéique.

Tableau 4

Aspect visuel				
Solution test	Avant stress	Après stress d'agitation	Après stress thermique	Après oxydation
F1	sans agrégats	agrégats	agrégats	sans agrégats
F2	sans agrégats	agrégats	agrégats	sans agrégats
F3	sans agrégats	sans agrégats	sans agrégats	sans agrégats

Seule la formulation F3 ne présente pas d'agrégats visibles dans tous les cas étudiés et supporte l'agitation et l'oxydation sans modification apparente.

5 **Exemple 6 : Mesure DLS (Dynamic Light Scattering)**

Chacune des compositions de l'exemple 1 (F1, F2 et F3) sont soumises ou non à un stress tel que défini à l'exemple 2. Les échantillons sont ensuite analysés dans un appareil mesurant la taille des particules par diffusion dynamique de la lumière (nanosizer Malvern). L'appareil permet de mesurer l'intensité de rayonnement de stokes émis par les particules de taille comprise entre 0,6 nm et 6 µm. Les particules > 100 nm correspondent aux agrégats de protéines. Le tableau 4 présente l'intensité relevée pour chaque échantillon pour des particules de taille > 100 nm (et < à 6 µm).

Tableau 5

DLS :% intensité des particules de taille > 100 nm				
Solution test	Avant stress	Après stress d'agitation	Après stress thermique	Après oxydation
F1	0	40*	49*	0
F2	0	46*	77*	3
F3	0	6	78	0

Seules les solutions oxydées et la formulation F3 agitée sont pratiquement identiques aux solutions non stressées.

- * A noter que les valeurs obtenues pour F1 et F2 avec le stress d'agitation et le stress thermique sont erronées car elles ne prennent pas en compte les particules > 6 µm (limite haute des particules pouvant être détectées) présente dans les échantillons. Ces particules > 6 µm sont nombreuses et observées à l'œil nu (voir exemple 4).

Exemple 7 : Stabilité des compositions (6 mois)

- Pour étudier la stabilité d'une formulation d'IgG selon l'invention, concentrée à 10%, 3 lots laboratoire (LL01, LL02 et LL03, issus de différents lots d'IgG à 5%) ont été fabriqués et mis en stabilité à 5°C et 25°C pour une durée de 6 mois.

La formulation des lots est pratiquement telle que définie dans la composition F3 de l'exemple 1 c'est-à-dire à une concentration finale en protéines de 100 g/l, en mannitol de 32 g/l, en glycine de 7 g/l et en polysorbate 80 de 40 + 5 mg/l.

- Les mesures de turbidité et d'AAC sont effectuées et l'aspect visuel est évalué sur chacun des lots comme décrit dans les exemples précédents.

- Quatre autres paramètres sont également mesurés au cours du temps : le dosage des anticorps contre l'antigène de surface de l'hépatite B (activité anti-HBs) selon la Pharmacopée Européenne (2.7.1), l'intégrité de la fonction Fc selon la Pharmacopée Européenne (2.7.9), le dosage de l'activateur de prékallikréine (pKa) et de la kallikréine et le dosage de la distribution de taille moléculaire (ou DTM).

Résultats :

- Turbidité, AAC, intégrité de la fonction Fc, teneurs en pKa et kallikréine et aspect visuel pour chaque lot LL01, LL02 et LL03 au cours du temps :

La turbidité, l'aspect, la fonction Fc, les teneurs en pré-kallikréine et kallikréine sont stables à 5°C et à 25°C dans les 3 lots et n'évoluent pas de manière significative.

Il n'y a par ailleurs, pas de variation significative des résultats d'activité anti-complémentaire qui restent tous dans la norme de la Pharmacopée Européenne.

- Activité anti-HBs des lots LL01, LL02 et LL03 au cours du temps :

A chaque échéance, le pourcentage d'activité anti-HBs est calculé par rapport à T0 de la manière suivante :

Pourcentage d'activité (%/T0) = (100 X Tx)/T0 avec Tx = activité à l'échéance.

10 La figure 2 donne une représentation des résultats obtenus en pourcentage d'activité anti-HBs durant les 6 mois de stabilité aux 2 températures de stockage.

L'activité anti-HBs des solutions en stabilité à 25°C diminue dès 1 mois dans les 3 lots pour devenir non conforme aux spécifications internes fixées ($\pm 20\%$) pour les LL01 et LL03, tandis que l'activité anti-HBs n'évolue pas de manière significative à 15 5°C. Ce phénomène de baisse de l'activité anti-HBs est comparable à celui observé sur l'IgG 5 % et n'est donc pas lié à la concentration des Ig.

- DTM :

20 Malgré une légère hausse au cours du temps, notamment à 25°C, les taux de polymères et de fragments restent dans les limites d'alerte (< 1 % pour les polymères et < 3 % pour les fragments).

A 6 mois le taux des dimères avoisine les 10 % et reste aussi dans les limites d'alerte fixées (< 13 %).

25 En conclusion, les trois lots de laboratoire d'IgG 10 % sont stables 6 mois à 5°C et 25°C sur les paramètres étudiés. On observe néanmoins une baisse de l'activité anti-HBs à 25°C qui semble corrélée à l'augmentation du taux de fragments.

Exemple 8 : dose optimale de détergent

Une étude quantitative du détergent est réalisée pour déterminer la dose optimale pour assurer la stabilité du produit.

5 On travaille sur des solutions à 100 g/l en protéines formulées à 7 g/l en glycine, 32 g/l en mannitol et à des doses croissantes de polysorbate 80 de 0 à 100 mg/l par pas de 10 mg/l (soit un total de 10 échantillons testés). Le pH de ces solutions est ajusté à 4,6.

Les mesures de turbidité et d'AAC sont effectuées et l'aspect visuel est évalué sur chaque échantillon comme décrit dans les exemples précédents.

- 10 • Turbidité et aspect visuel :

Seule la formulation sans polysorbate 80 présente une modification de son aspect visuel après agitation et une turbidité très élevée: il y a apparition d'agrégats.

- AAC :

15 Les résultats montrent que l'activité anti-complémentaire (AAC) est non conforme à la norme de la pharmacopée européenne pour les échantillons dosés à 10 et 20 mg/l de polysorbate 80 (Figure 3).

Une limite inférieure de 30 mg/l de polysorbate est donc retenue car l'activité anti-complémentaire reste conforme pour des concentrations supérieures à 30 mg/l.

20 Entre 40 et 100 mg/l de polysorbate 80, l'activité anti-complémentaire, ainsi que tous les autres paramètres testés, restent constants.

Exemple 9 : Stabilité d'une formulation à 50mg/l polysorbate 80 :

Trois lots de la formulation suivante ont été préparés :

- 100 g/l d'IgG
- 25 - 32 g/l de mannitol

- 7 g/l de glycine
- 50 mg/l de polyoxyéthylènesorbitanne-monooléate (polysorbate 80).

Le pH est ajusté à $4,6 \pm 0,2$.

La stabilité de ces trois lots a été testée à 5°C et à 25°C, pendant 18 mois.

- 5 Pour cela, les paramètres suivants ont été contrôlés.

Tableau 6 :

analyses	Valeurs attendues
Aspect de la solution	limpide ou légèrement opalescent, incolore ou légèrement jaune, sans particules visibles
pH	$4,6 \pm 0,2$
Turbidité (NTU)	pas d'évolution / To
Polymères (%)	< 1,0 %
Dimères (%)	< 13,0 %
Monomères (%)	NA
Fragments (%)	< 3,0 %
AAC (%)	≤ 50 %
Anti-HBs (UI/ml)	± 20 % valeur à To
IgG (g/l)	pas d'évolution / To
IgG1 (g/l)	pas d'évolution / To
IgG2 (g/l)	pas d'évolution / To
IgG3 (g/l)	pas d'évolution / To
IgG4 (g/l)	pas d'évolution / To
pKa (UI/ml)	≤ 35 UI/ml
Kallicréine (UI/ml)	< 2 UI/ml
Fonction Fc (%)	≥ 60 %

Les trois lots se sont montrés stables à 5°C, les paramètres mesurés étant conformes aux spécifications de la Pharmacopée Européenne après 18 mois de stockage.

- 10 Les trois lots se sont montrés stables à 25°C également, les paramètres mesurés étant conformes aux spécifications de la Pharmacopée Européenne après 18 mois de stockage, seul le taux de fragments a présenté une hausse et l'activité anti-HBs a présenté une baisse, mais qui reste conforme aux spécifications de la Pharmacopée Européenne.

REVENDEICATIONS

1. Composition d'immunoglobulines G comprenant du mannitol, de la glycine et un détergent non ionique, caractérisée en ce que la concentration en immunoglobulines G est de 100 g/l \pm 20g/l.
5
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que la concentration en glycine est comprise entre 4 g/l et 10 g/l.
3. Composition selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que la concentration en détergent non ionique est comprise entre 20 et 100 mg/l.
- 10 4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la concentration en mannitol est comprise entre 20 g/l et 50 g/l.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 4, sous forme liquide.
6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, dans laquelle les seuls excipients sont le mannitol, la glycine et ledit détergent non ionique.
- 15 7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le détergent non ionique est choisi parmi le polyoxyéthylènesorbitanne-monooléate, le polyoyéthylènesorbitanne-monolaurate, l'octoxinol 10 et le polyéthylène polypropylène glycol.
8. Composition selon la revendication 7, comprenant de 20 à 100 mg/l de polyoxyéthylènesorbitanne-monooléate (polysorbate 80).
20
9. Composition selon la revendication 8, comprenant de 30 à 60 mg/l de polyoxyéthylènesorbitanne-monooléate.
10. Composition selon la revendication 9, comprenant de 40 à 50mg/l de polyoxyéthylènesorbitanne-monooléate, de préférence 50mg/l.
- 25 11. Composition selon la revendication 10, comprenant :

- 100 g/l d'IgG
- 32 g/l de mannitol
- 7 g/l de glycine
- 50 mg/l de polyoxyéthylènesorbitanne-monooléate (polysorbate 80).

5 12. Composition selon la revendication 11, présentant un pH de $4,6 \pm 0,2$.

13. Composition selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que les immunoglobulines G sont obtenues par fractionnement du plasma humain.

1/2

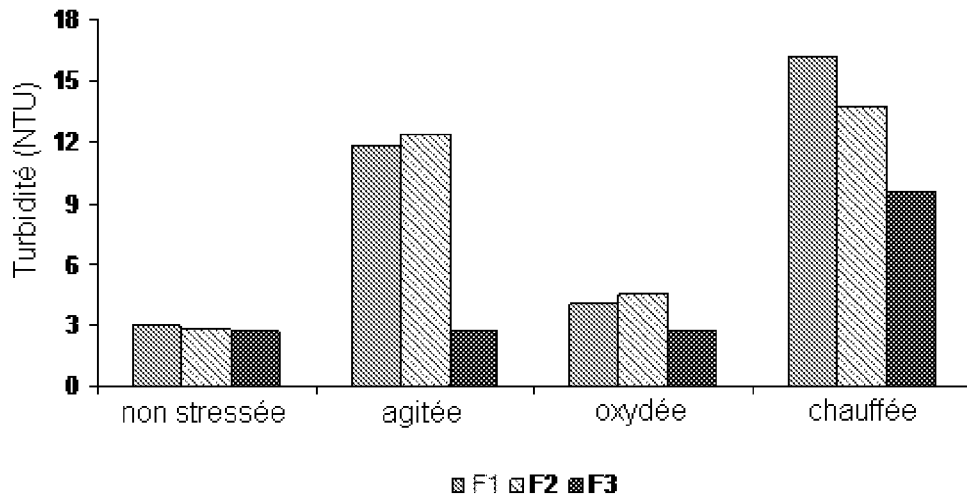


Figure 1

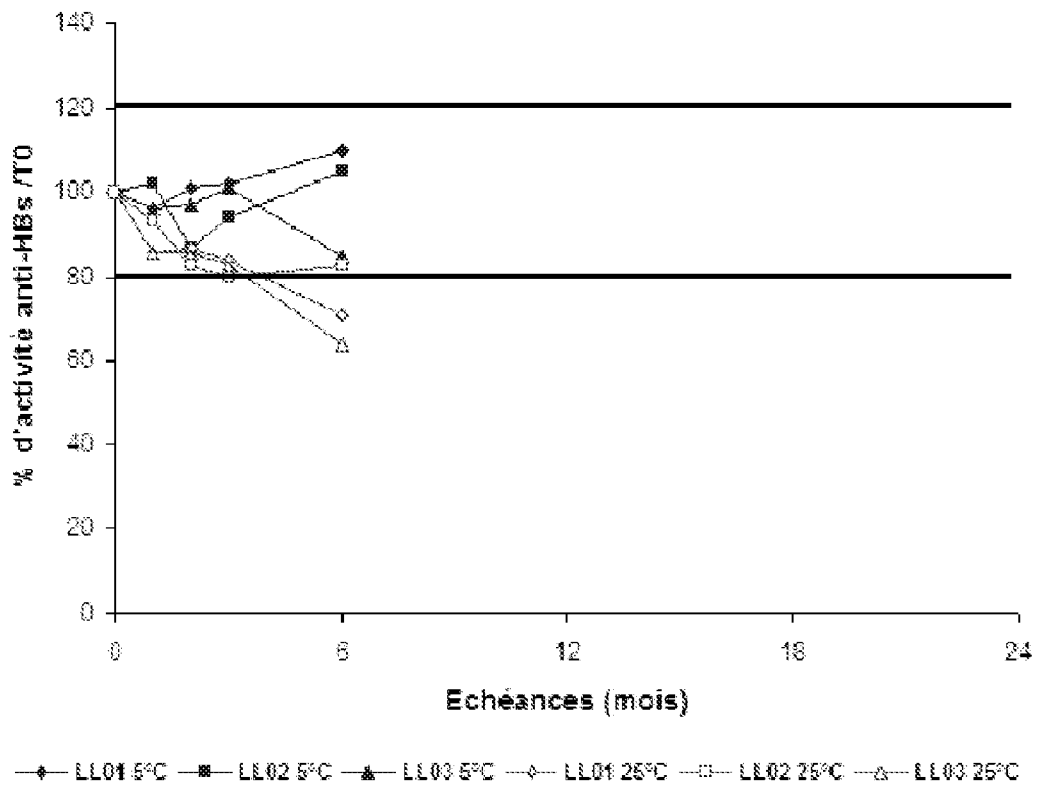


Figure 2

2/2

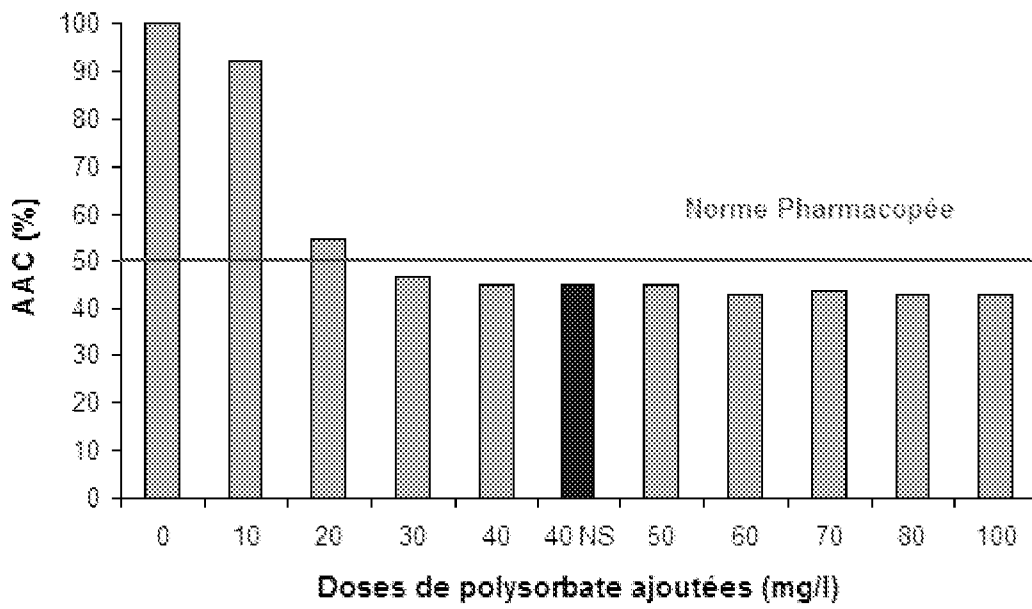


Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/052714

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61K39/395 A61P37/00
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 853 551 A (LAB FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT [FR]) 15 October 2004 (2004-10-15) examples 1-3	1-13
A	SCHÜLE S ET AL: "Stabilization of IgG1 in spray-dried powders for inhalation." EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS : OFFICIAL JOURNAL OF ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR PHARMAZEUTISCHE VERFAHRENSTECHNIK E.V AUG 2008, vol. 69, no. 3, August 2008 (2008-08), pages 793-807, XP023519539 ISSN: 0939-6411 page 794, left-hand column, paragraph 2.1 -/--	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 2010

Date of mailing of the international search report

26/04/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, Katell

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/052714

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DANI BHAS ET AL: "High concentration formulation feasibility of human immunoglobulin G for subcutaneous administration." JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES JUN 2007, vol. 96, no. 6, June 2007 (2007-06), pages 1504-1517, XP002540954 ISSN: 0022-3549 page 1507, left-hand column, paragraph 2</p>	1-13
A	<p>WO 97/04801 A (GENENTECH INC [US]) 13 February 1997 (1997-02-13) cited in the application table 2</p>	1-13
A	<p>MATHEUS SUSANNE ET AL: "A critical evaluation of Tm(FTIR) measurements of high-concentration IgG1 antibody formulations as a formulation development tool." PHARMACEUTICAL RESEARCH JUL 2006, vol. 23, no. 7, July 2006 (2006-07), pages 1617-1627, XP019405151 ISSN: 0724-8741 page 1618, left-hand column, last paragraph</p>	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2009/052714

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
FR 2853551	A	15-10-2004	AU 2004229205 A1	28-10-2004
			BR PI0409249 A	18-04-2006
			CA 2521909 A1	28-10-2004
			EP 1610819 A2	04-01-2006
			WO 2004091656 A2	28-10-2004
			JP 2006522780 T	05-10-2006
			US 2007036779 A1	15-02-2007
			WO 9704801	A
BR 9609743 A	02-03-1999			
CA 2226575 A1	13-02-1997			
CN 1191490 A	26-08-1998			
CN 1539505 A	27-10-2004			
EP 1516628 A1	23-03-2005			
EP 0845997 A1	10-06-1998			
IL 122910 A	23-05-2002			
JP 11510170 T	07-09-1999			
JP 2007238628 A	20-09-2007			
JP 2007217430 A	30-08-2007			
NO 980335 A	26-03-1998			
NO 2007012 I1	29-11-2007			
NZ 313503 A	28-01-2000			
NZ 500539 A	30-11-2001			

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2009/052714

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 INV. A61K39/395 A61P37/00
 ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 853 551 A (LAB FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT [FR]) 15 octobre 2004 (2004-10-15) exemples 1-3	1-13
A	SCHÜLE S ET AL: "Stabilization of IgG1 in spray-dried powders for inhalation." EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS : OFFICIAL JOURNAL OF ARBEITSGEMEINSCHAFT FÜR PHARMAZEUTISCHE VERFAHRENSTECHNIK E.V AUG 2008, vol. 69, no. 3, août 2008 (2008-08), pages 793-807, XP023519539 ISSN: 0939-6411 page 794, colonne de gauche, alinéa 2.1 -/--	1-13

<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*&* document qui fait partie de la même famille de brevets</p>	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 15 avril 2010	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 26/04/2010
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Le Flao, Katell

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2009/052714

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DANI BHAS ET AL: "High concentration formulation feasibility of human immunoglobulin G for subcutaneous administration." JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES JUN 2007, vol. 96, no. 6, juin 2007 (2007-06), pages 1504-1517, XP002540954 ISSN: 0022-3549 page 1507, colonne de gauche, alinéa 2</p>	1-13
A	<p>WO 97/04801 A (GENENTECH INC [US]) 13 février 1997 (1997-02-13) cité dans la demande tableau 2</p>	1-13
A	<p>MATHEUS SUSANNE ET AL: "A critical evaluation of Tm(FTIR) measurements of high-concentration IgG1 antibody formulations as a formulation development tool." PHARMACEUTICAL RESEARCH JUL 2006, vol. 23, no. 7, juillet 2006 (2006-07), pages 1617-1627, XP019405151 ISSN: 0724-8741 page 1618, colonne de gauche, dernier alinéa</p>	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/052714

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
FR 2853551	A	15-10-2004	AU	2004229205 A1	28-10-2004
			BR	PI0409249 A	18-04-2006
			CA	2521909 A1	28-10-2004
			EP	1610819 A2	04-01-2006
			WO	2004091656 A2	28-10-2004
			JP	2006522780 T	05-10-2006
			US	2007036779 A1	15-02-2007
WO 9704801	A	13-02-1997	AU	716785 B2	09-03-2000
			BR	9609743 A	02-03-1999
			CA	2226575 A1	13-02-1997
			CN	1191490 A	26-08-1998
			CN	1539505 A	27-10-2004
			EP	1516628 A1	23-03-2005
			EP	0845997 A1	10-06-1998
			IL	122910 A	23-05-2002
			JP	11510170 T	07-09-1999
			JP	2007238628 A	20-09-2007
			JP	2007217430 A	30-08-2007
			NO	980335 A	26-03-1998
			NO	2007012 I1	29-11-2007
			NZ	313503 A	28-01-2000
			NZ	500539 A	30-11-2001