

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 241**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2004 E 04818790 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **04.11.2015 EP 1687028**

54 Título: **Preparaciones de inmunoglobulina con estabilidad incrementada**

30 Prioridad:

18.11.2003 EP 03026539

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

28.01.2016

73 Titular/es:

**CSL BEHRING AG (100.0%)
WANKDORFSTRASSE 10
3014 BERN, CH**

72 Inventor/es:

**BOLLI, REINHARD;
HODLER, GERHARD y
STYGER, REGULA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 398 241 T5

DESCRIPCIÓN

Preparaciones de inmunoglobulina con estabilidad incrementada

La presente invención se refiere a una preparación de inmunoglobulina con estabilidad incrementada, que contiene prolina como estabilizante y tiene un pH de 4,2 a 5,4. La invención se refiere además a una composición farmacéutica y a un procedimiento de estabilización de preparaciones de inmunoglobulina.

Las preparaciones de proteínas, en particular las preparaciones de inmunoglobulina para inyección intravenosa, se han utilizado desde hace tiempo. Las proteínas y la inmunoglobulina en particular tienden a formar agregados y/o dímeros y a fragmentarse o desnaturalizarse. Si tales soluciones se inyectan por vía intravenosa, los agregados pueden provocar reacciones secundarias graves inclusive shock anafiláctico. Con el fin de evitar la agregación, la fragmentación, etc. en tales soluciones de proteínas y para mejorar su estabilidad, se han intentado una serie de tratamientos en el estado actual de la técnica. Por ejemplo, para mejorar la estabilidad en el almacenamiento, a menudo las preparaciones de IgG intravenosa para uso clínico se liofilizan (liofilización), pero tales preparaciones se deben reconstituir con un diluyente antes de usar. El paso de reconstitución es incómodo y consume mucho tiempo, y aumenta la probabilidad de contaminación del producto. Otra manera, bien conocida en la técnica, de mejorar la estabilidad y el almacenamiento de la inmunoglobulina es la adición de excipientes estabilizantes de la proteína a la preparación de IgG. Los excipientes conocidos incluyen azúcares, polioles, aminoácidos, aminas, sales, polímeros y tensioactivos. Tales estrategias de estabilización de los productos farmacéuticos de proteínas son abundantes en la técnica. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos 4.499.073 (Tenold) mejora la estabilización a través de la selección del pH y la fuerza iónica. El documento JP 54020124 divulga la adición de un aminoácido a una preparación intramuscular para hacer que el almacenamiento sea estable y seguro. Los documentos JP 57031623 y JP 57128635 divulgan el uso de arginina y/o lisina con NaCl en preparaciones de IgG de 5 a 15 % para lograr la estabilidad a largo plazo en una preparación intramuscular. El documento JP 56127321 divulga la adición a IgG de un alcohol de azúcar que funciona mejor que la glucosa utilizada previamente para suprimir la agregación. El documento JP 4346934 divulga el uso de baja conductividad (menos de 1 mmho), pH 5,3 a 5,7 y opcionalmente uno o más estabilizantes incluido PEG, albúmina sérica humana y manitol. El documento US 4.439.421 (Hooper) instruye acerca de la adición de una macromolécula hidrófila, un poliol y otra proteína para lograr estabilidad ante la generación de ACA (actividad anti-complemento). El documento US 5.945.098 (Samo) divulga la estabilización de soluciones isotónicas por adición de aminoácidos (glicina 0,1 a 0,3 M) y detergentes no iónicos (polisorbato) y PEG. El documento US 4.186.192 (Lundblad) divulga diversos aditivos, incluidos aminoácidos, sin especificar, sin embargo, el uso de aminoácidos individuales específicos. Esta divulgación incluye la estabilización de IgG con maltosa y además glicina hasta 0,1 M. El documento US 4.362.661 (Ono) divulga el uso de aminoácidos neutros y básicos para impartir estabilidad a un producto de IgG al 5 %. Todos los documentos mencionados antes divulgan preparaciones de IgG de un pH ácido pero todavía relativamente alto, superior a 5,2.

Además de prevenir la formación de agregados de inmunoglobulina, también se ha reconocido que la formación de dímeros, en particular de IgG, puede ser perjudicial para las preparaciones de IgG para administración por vía intravenosa. Aunque los dímeros de IgG no son conocidos por causar shock anafiláctico, se encontró, sin embargo, que preparaciones de IgG con un contenido de dímero elevado no son tan bien toleradas en inyección intravenosa y pueden provocar efectos secundarios indeseados, incluidos fiebre, náuseas y a veces hipotensión arterial. Los efectos hipotensores fueron detectados en un modelo de ratas por Bleaker et al (Vox Sanguinis 52, 281-290, 1987), y esto también muestra una correlación aparente con el contenido de dímero. La formación de dímeros no llega a ser un problema cuando la preparación de IgG se liofiliza poco después de que se produce. Sin embargo, si la preparación está destinada al almacenamiento en forma líquida no liofilizada, la concentración de dímero aumenta con el tiempo de almacenamiento.

La patente de los Estados Unidos 5.871.736 (Bruegger et al.) divulga preparaciones de inmunoglobulina, particularmente preparaciones líquidas de IgG para infusión intravenosa que contienen uno o más estabilizantes anfifílicos para lograr estabilidad ante la formación de dímeros. Los estabilizantes anfifílicos incluyen el ácido nicotínico y sus derivados, en particular nicotinamida y, principalmente, en conjunción con los anteriores, aminoácidos que tienen cadenas laterales lipófilas sin carga, por ejemplo fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina, prolina y valina. La divulgación experimental de este documento del estado anterior de la técnica divulga aminoácidos siempre en conjunto con nicotinamida, y las concentraciones divulgadas para los aminoácidos son 200 mmol/l para prolina, 80 mmol/l para glicina y 120 mmol/l para isoleucina.

El rango de pH para las preparaciones divulgadas en el documento US 5.871.736 se establece en general como entre 4 y 8, pero la divulgación real de los ejemplos indica un pH de 5,3.

Aunque la patente de los Estados Unidos anteriormente mencionada divulga preparaciones de IgG en las que la formación de dímero ha sido suprimida en cierta medida, sigue siendo deseable proporcionar preparaciones de proteínas, en particular preparaciones de inmunoglobulina que presenten una estabilización incrementada, en particular a temperatura ambiente.

Los inventores han encontrado que se puede lograr un grado de estabilización sorprendentemente alto de las preparaciones de proteína líquidas, ajustando el pH de la preparación final a 4,2 y 5,4 y agregando como estabilizante un aminoácido básico o no polar.

5 Por lo tanto, la presente invención proporciona una preparación de inmunoglobulina que tiene una estabilidad incrementada, en la que la preparación contiene prolina como estabilizante que no se utiliza en combinación con nicotinamida y en la que la preparación tiene un pH de 4,2 a 5,4. Cuando se utiliza prolina como estabilizante, preferentemente es L-prolina. También es posible utilizar equivalentes de prolina, por ejemplo análogos de prolina.

10 Sorprendentemente, se encontró que la adición de prolina por sí sola, sin otros estabilizantes (como nicotinamida), y el ajuste del pH de la preparación final aumentan notablemente la estabilidad de esas preparaciones, particularmente a temperatura ambiente. La estabilidad incrementada se muestra por la mejor estabilidad de las preparaciones a temperaturas entre alrededor de 2 °C y alrededor de 40 °C, especialmente a temperatura ambiente que preferentemente varía entre alrededor de 10 °C, más preferentemente alrededor de 15 °C, aún más preferentemente alrededor de 20 °C y alrededor de 30 °C, más preferentemente alrededor de 25 °C. La estabilidad incrementada de las preparaciones de la invención también es visible a temperaturas superiores entre alrededor de 15 30 °C y alrededor de 40 °C, incluida la temperatura corporal de alrededor de 37 °C. Preferentemente, la estabilidad incrementada se define además, alternativa o adicionalmente, como mayor tiempo de almacenamiento, menor fragmentación, menor formación de agregados, menor formación de dímeros y/o menor decoloración. Mayor tiempo de almacenamiento significa que las preparaciones de la invención son preferentemente estables durante al menos 30 días, preferentemente al menos 60 días, más preferentemente al menos 90 días, aún más preferentemente al 20 menos 120 días, muy preferentemente durante aún más tiempo.

Menor agregación significa preferentemente que las preparaciones muestran un menor porcentaje de agregados (en particular en el caso de Ig) que las preparaciones convencionales. Preferentemente, el contenido de dímero de las preparaciones es inferior a alrededor de 12 %, preferentemente inferior a alrededor de 10 %, más preferentemente inferior a alrededor de 8 %. Menor coloración significa preferentemente que la densidad óptica de las formulaciones de la invención es entre alrededor de 20 % y 60 % menor que la de las formulaciones convencionales. 25

En general, las preparaciones de inmunoglobulina de la presente invención son formulaciones líquidas que son útiles para inyección intravenosa. Tales preparaciones se pueden almacenar y son estables en forma líquida y por lo tanto no requieren liofilización ni otro tratamiento y pueden ser utilizadas fácilmente.

30 Preferentemente, la preparación de inmunoglobulina es una preparación de anticuerpos en la cual los anticuerpos pueden ser de cualquier idiotipo pero preferentemente IgG, IgA o IgM. Las preparaciones de IgG son particularmente preferentes. Las inmunoglobulinas pueden ser policlonales o monoclonales y se pueden aislar de la sangre humana o animal o producir por otros medios, por ejemplo mediante tecnología de recombinación del ADN o tecnología del hibridoma. En general, las inmunoglobulinas se obtienen del plasma sanguíneo por fraccionamiento con alcohol, que se puede combinar con otras técnicas de purificación como cromatografía, adsorción o precipitación. Las 35 inmunoglobulinas se pueden tratar con trazas de enzimas (por ejemplo, pepsina) con el fin de reducir la actividad anticomplementaria o se pueden utilizar enteras.

Las preparaciones se pueden obtener por procedimientos conocidos en la técnica, excepto que el pH de la preparación final se ajusta a un pH relativamente alto pero ácido, es decir, en el rango de pH alrededor de 4,2 a 5,4. Se encontró que este rango de pH es particularmente útil para mejorar el almacenamiento de las características de las preparaciones de inmunoglobulina. El rango de pH es preferentemente de 4,5 a alrededor de 5,2, prefiriéndose particularmente un rango de pH de alrededor de 4,6 a 5,0, y especialmente el pH 4,8. 40

En el curso del desarrollo de las preparaciones de acuerdo con la presente invención, también se encontró que aumentar la concentración final del estabilizante permite una sorprendente mejora en las características de almacenamiento y en la estabilidad de las preparaciones. Por lo tanto, el estabilizante se agrega a una concentración final de al menos 0,2 M. Preferentemente, la concentración final es entre 0,2 y 0,4 M, más preferentemente entre 0,2 y 0,3 M, y muy preferentemente de 0,25 M. 45

La presente invención es particularmente útil para las preparaciones de inmunoglobulina con una concentración relativamente alta de proteína. La preparación final de la presente invención tiene una concentración de proteína de alrededor de 5 a 25 % p/v, preferentemente de alrededor de 6 a 15 % p/v, más preferentemente de alrededor de 8 a 50 12 % p/v, muy preferentemente de alrededor de 10 % p/v. La concentración de proteína final dependerá de diversos factores, como la vía de administración, el tipo de enfermedad que se va a tratar, etc. Los expertos podrán determinar la concentración de proteína óptima para la aplicación prevista. Por ejemplo, para infusión intravenosa, la preparación final de la invención tiene preferentemente una concentración de proteína de alrededor de 15 a 20 % p/v, preferentemente de alrededor de 8 a 12 % p/v. En el caso de IgG para uso intravenoso, es particularmente útil 55 10 % p/v, es decir, 100 g de IgG/litro. Para la administración subcutánea se puede elegir una dosis mayor, por ejemplo de alrededor de 15 a 20 % p/v.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la preparación de inmunoglobulina de la presente invención, así como aditivos farmacéuticamente aceptables. Tales aditivos pueden ser excipientes, diluyentes tal como agua y otras sustancias tales como sustancias no amortiguadoras, por ejemplo cloruro de sodio, glicina, sacarosa, maltosa y sorbitol. Tales composiciones farmacéuticas se pueden administrar por diferentes vías. Para administración intravenosa se puede utilizar una dosis de alrededor de 0,2 g, preferentemente de alrededor de 0,5 g a 2,0 g de inmunoglobulina/kilogramo de peso corporal, al día.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento de estabilización de las preparaciones de inmunoglobulina, que consiste en proporcionar una solución acuosa de proteína y agregarle prolina como estabilizante, donde el pH de la solución se ajusta a un valor de pH de alrededor de 4,2 a 5,4. El pH se ajusta preferentemente a un valor dentro de los rangos preferentes indicados antes, siendo particularmente preferente el pH 4,8. El procedimiento comprende, preferentemente, ajustar las concentraciones de proteína y las concentraciones de estabilizante.

En particular, el procedimiento comprende los pasos de proporcionar una solución acuosa de inmunoglobulina con una concentración de proteína de alrededor de 5 a 25 % p/v, ajustar el pH de la solución a 4,2 y 5,4, y agregar prolina como estabilizante a la solución para lograr una concentración final de estabilizante de 0,2 a 0,4 M a fin de obtener una preparación de inmunoglobulina estable. Se conocen varios procesos para aislar inmunoglobulinas del plasma humano o de sus fracciones. Las inmunoglobulinas se pueden purificar por ejemplo por fraccionamiento con etanol frío y/o fraccionamiento con ácido octanoico y/o procedimientos cromatográficos. Los procedimientos de purificación que se prefieren particularmente para los fines de la presente invención incluyen el fraccionamiento con etanol, seguido de fraccionamiento con ácido octanoico, seguido de tratamiento a pH bajo, cromatografía y nanofiltración. Al producir inmunoglobulinas para aplicaciones intravenosas tales como las de la presente invención, se debería tener preferentemente especial cuidado de reducir o eliminar los complejos inmunológicos con actividad anti-complemento y proteasas como calicreína o plasminógeno. La inmunoglobulina que se va utilizar en las preparaciones de proteína de la presente invención se lleva a la concentración deseada entre alrededor de 5 y 25 % p/v por procedimientos conocidos, por ejemplo por ultrafiltración. El pH de la preparación de inmunoglobulina líquida se ajusta a un pH de 4,2 a 5,4, y el estabilizante prolina se agrega a la solución a una concentración final de al menos alrededor de 0,2 M. Preferentemente la prolina se agrega a una concentración de alrededor de 0,2 M a 0,4 M, preferentemente de alrededor de 0,25 M.

La presente invención se ilustrará ahora por medio de los ejemplos y las figuras siguientes.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el contenido de agregados como determinado por HPLC para una solución de IgG al 8 % que contiene prolina 0,25 M o glicina 0,25 M.

La figura 2 muestra el contenido de dímeros como determinado por HPLC para una solución de IgG al 8 % que contiene prolina 0,25 M o glicina 0,25 M.

La figura 3 muestra el contenido de fragmentos como determinado por SDS PAGE de soluciones de IgG al 8 % que contienen prolina 0,25 M o glicina 0,25 M.

La figura 4 muestra la densidad óptica (UV 350-500 nm) de dos soluciones de IgG que contienen prolina 0,25 M o glicina 0,25 M.

Ejemplo 1 Fabricación de una preparación de proteína de acuerdo con la invención.

El material de partida para el proceso de fabricación de Ig intravenosa es un intermediario con licencia del proceso de fraccionamiento con etanol de Kistler Nitschmann. Se trata de una precipitación de la fracción de inmunoglobulina del plasma utilizando etanol al 19 % a pH 5,8

Las proteínas de alto peso molecular, los complejos de lipoproteínas y otros contaminantes se precipitaron usando ácido octanoico y después se separaron por filtración en presencia de un auxiliar de filtración. Después se concentró sobrenadante antes de someterlo a un paso de incubación a pH bajo.

Luego el pH se ajustó a pH 6,5 y el material se clarificó adicionalmente por filtración para separar las IgA e IgM precipitadas. Después la solución enriquecida en IgG se purificó finalmente en una resina de intercambio aniónico, de acuerdo con el documento U.S. 6.093.324, excepto que la carga fue de 150 gramos por litro de resina.

La eliminación viral se logró utilizando un nanofiltro.

Formulación: el nanofiltrado se concentró hasta 3 % de proteína y se diafiltró contra 5 volúmenes de agua, seguido de concentración de la IgG hasta 120 g por litro. Finalmente, el concentrado se estabilizó con L-prolina 250 mM, se diluyó a 100 g de IgG por litro y el pH se mantuvo en 4,8. El granel formulado se filtró a través de un filtro de membrana de 0,2 µm.

Ejemplo 2 Análisis de las preparaciones de IgG de acuerdo con la invención.

El concentrado de IgG, purificado del plasma mediante una combinación de pasos de precipitación y cromatografía y el virus inactivado de acuerdo con el ejemplo 1 se fraccionó en tres porciones con 260 ml formulados a pH 4,5, 420 ml formulados a pH 4,8 y 260 ml formulados a pH 5,1. Después las formulaciones se dividieron, una mitad se formuló con glicina 0,25 M y la otra con prolina 0,25 M. La concentración final de proteína fue de 8 % p/v. Se distribuyeron alícuotas de 10 ml en viales de vidrio tipo I de 10 ml (tapones de goma tipo I).

Las alícuotas se almacenaron a tres temperaturas diferentes, 2 a 8 °C, 26 °C y 45 °C. Las muestras entre 2 y 8 °C se almacenaron en presencia de luz (Phillips TLD 18W/33). Las muestras se incubaron a 26 °C o a 45 °C durante al menos dos meses en la oscuridad. Los resultados se muestran en las figuras 1 a 4.

Agregados

Los niveles de agregados para la IgG formulada con glicina fueron superiores a los de la IgG formulada con prolina en todas las condiciones analizadas.

Se promovió una formación significativa de agregados mediante la incubación a 45 °C. Ésta fue similar tanto para las formulaciones de prolina como de glicina. El pH bajo promovió la formación de agregados a 45 °C, donde las formulaciones de pH 4,5 que contenían 12,2 % (prolina) y 16,7 % (glicina) se agregaron a los 90 días. En contraposición, las formulaciones de pH 5,1 que contenían 6,3 % (prolina) y 8,3 % (glicina) se agregaron a los 90 días.

Dímeros

Los niveles de dímeros fueron influenciados por el pH, la temperatura y el tipo de excipiente. El pH demostró ser el factor más importante, observándose mayores niveles de dímeros a medida que aumentaba el pH de la formulación. Esto se observó tanto para las formulaciones de glicina como de prolina. Los resultados indican que las formulaciones que contienen prolina son capaces de mantener los niveles de dímero más bajos que las formulaciones de glicina equiparables. La temperatura de incubación modula el equilibrio monómero/dímero, favoreciendo las temperaturas menores la formación de dímeros.

Monómeros y dímeros

El contenido combinado de monómero/dímero para todas las formulaciones a 2-8 °C y a 26 °C permaneció superior al 90 %. Se observaron niveles menores en soluciones de IgG formuladas con glicina debido al mayor contenido de agregados. La incubación a 45 °C dio lugar a tres formulaciones que tenían niveles inferiores a 90 % después de 60 días (85,1 % de glicina, pH 4,5, 89,1 % de prolina, pH 4,5 y 89,1 % de glicina, pH 4,8). Nuevamente, esos resultados resaltan la mayor capacidad de la prolina con respecto a la glicina para conservar la integridad molecular de las moléculas de IgG.

Fragmentos de IgG

Los resultados indican que las formulaciones de glicina contienen niveles de fragmentos ligeramente inferiores en comparación con las de prolina. La temperatura de incubación y el pH demostraron ser los factores más importantes que influyen sobre la fragmentación de IgG. A 45 °C los niveles de fragmentos para las formulaciones de prolina variaron de 5,2 % (pH 5,1) a 5,8 % (pH 4,5), mientras que en las formulaciones de glicina variaron de 4,3 % (pH 5,1) a 4,8 % (pH 4,8). A pH elevado (4,8 a 5,1) hubo menos fragmentación.

Aspecto de la solución

Se investigaron cuatro parámetros principales: claridad, turbidez, partículas y coloración visible. Los parámetros tales como aspecto, claridad y turbidez fueron satisfactorios. La coloración (amarillo/marrón) de las soluciones se produjo durante el período de incubación y se relacionó tanto con la temperatura de incubación como con la exposición a la luz. La coloración de las formulaciones de IgG se controló usando la prueba de densidad óptica (UV 350-500 nm). El aumento del color se asoció con la exposición a la luz y con mayores temperaturas de incubación. Las formulaciones de glicina presentaron densidades ópticas que fueron entre 25 % y 48 % superiores a las de las formulaciones de prolina correspondientes. Estos resultados proporcionan prueba adicional de que la prolina es un mejor estabilizante que la glicina en soluciones de IgG. A pH elevado (4,8 a 5,1) hubo menos coloración que a un pH inferior (4,5).

Ejemplo 3 Estabilidad de las preparaciones de IgG de acuerdo con la invención (dependencia del pH).

El concentrado de IgG, purificado del plasma mediante una combinación de pasos de precipitación y cromatografía y el virus inactivado según el ejemplo 1 se fraccionó en dos porciones y se formuló con o sin 400 mmol/L de L-prolina a pH 4,2, 4,8, 5,3 y 6,8. La concentración final de proteína fue de 12 % p/v. Se distribuyeron alícuotas de 10 ml en viales de vidrio y se incubaron a 40 °C durante al menos 3 meses en la oscuridad. En el tiempo 0, y después de 90

días de incubación, las muestras se analizaron por HPLC para determinar la presencia de agregados, IgG dimérica y monomérica, mediante fotometría para absorbancia a 350 - 500 nm, mediante SDS PAGE (fragmentos) y anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (anti-HBs). Los resultados presentados en la tabla 1 muestran que la mejor estabilidad de la solución de IgG se obtiene a un pH ácido moderado de 4,8 a 5,3.

Tabla 1: Dependencia del pH de la estabilidad de una preparación de proteína (10 %) de acuerdo con la invención

Aditivo	Ninguno							
pH	4,2		4,8		5,3		6,8	
Tiempo de incubación (días)	0	90	0	90	0	90	0	90
Agregado (%)	3,5	40,2	1,16	5	1,31	3,1	3,22	2,7
Dímero (%)	6,5	3,6	10,6	11,1	12,2	13,8	16,4	19,0
Fragmentos	1,4	2,6	1,3	3,5	1,3	3,6	1,5	3,4
Absorbancia (350 a 500 nm)	0,107	0,159	0,125	0,186	0,156	0,205	0,355	0,936
anti-HBs (IU/ml)	7,0	2,6	6,5	3,5	6,3	3,5	6,3	3,5
Aditivo	L-Prolina (400 mMol/L)							
pH	4,2		4,8		5,3		6,8	
Tiempo de incubación (días)	0	90	0	90	0	90	0	90
Agregado (%)	1,97	26,4	0,82	4,5	0,85	2,5	1,78	2,9
Dímero (%)	4,3	4	6,4	6,2	7,8	9,5	11,8	13,9
Fragmentos (%)	1,4	2,9	1,3	3,5	1,3	4,0	1,5	3,6
Absorbancia (350 a 500 nm)	0,202	0,234	0,134	0,213	0,125	0,235	0,249	0,55
anti-HBs (IU/ml)	7,0	2,9	6,5	3,5	6,3	4,0	6,3	3,6

Ejemplo 4 Estabilidad de las preparaciones de IgG de acuerdo con la invención formuladas con diferentes aditivos.

Los concentrados de IgG, purificados del plasma mediante una combinación de pasos de precipitación y cromatografía y el virus inactivado según el ejemplo 1 se formularon con aditivos de diferentes clases de sustancias (azúcares y alcoholes de azúcar, aminoácidos y detergentes) a pH 4,2, 4,8, 5,3 y 6,8. La concentración final de proteína fue de 10 % p/v. Se distribuyeron alícuotas de 10 ml en viales de vidrio y se incubaron a 37 °C o 40 °C durante al menos 3 meses en la oscuridad. Después de 90 días de incubación la muestra se analizaron por HPLC para determinar agregados, IgG dimérica, monomérica, y fragmentos, mediante fotometría por absorbancia a 350 - 500 nm y mediante ELISA para determinar anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (anti-HBs).

Los resultados presentados en la tabla 2 muestran que la mejor estabilidad de la solución de IgG se obtiene a un pH ácido moderado de 4,8 o 5,3 con las formulaciones más favorables que tienen L-prolina.

Tabla 2: Estabilidad de una preparación de proteína (10 %) de acuerdo con la invención, formulada con diferentes aditivos y a diferente pH.

pH 4,2							
Temp. de incub.	Aditivo	Absorbancia	HPLC				anti-HBs
		350-500 nm	Agregados	Dímeros	Monómeros	Fragmentos	IU/mL
			%	%	%	%	
37 °C	D(-) Manitol (10 %)	0,134	3,00	4,19	87,37	5,44	1,63
	Sacarosa (10 %)	0,271	3,18	3,38	87,87	5,57	1,59
	Maltosa (10 %)	0,422	5,30	3,83	85,54	5,33	1,42
	Glicina (250 mmol/L)	0,177	5,82	3,75	84,64	5,79	1,57
	L-Prolina (250 mmol/L)	0,166	5,50	2,98	85,87	5,64	1,70
	Polisorbato 80 (0,02 %)	0,166	7,03	3,54	83,94	5,49	1,53
	Ninguno	0,172	7,83	3,67	83,11	5,39	1,52
40 °C	Glicina (400 mmol/L)	0,251	22,06	5,27	68,59	4,08	2,44
	L-Prolina (400 mmol/L)	0,231	26,38	3,96	65,77	3,89	2,87
	L-Isoleucina (200 mmol/L)	0,257	52,03	2,59	41,25	4,13	1,74
	L-Metionina (200 mmol/L)	0,175	37,66	3,32	55,41	3,61	2,44
	L-Valina (250 mmol/L)	0,197	29,30	4,40	62,67	3,63	2,66
pH 4,8							
Temp. de incub.	Aditivo	Absorbancia	HPLC				anti-HBs
		350-500 nm	Agregados	Dímeros	Monómeros	Fragmentos	IU/mL
			%	%	%	%	

ES 2 398 241 T5

(continuación)

37 °C	D(-)Manitol (10 %)	0,147	3,45	7,08	86,84	2,62	1,93
	Sacarosa (10 %)	0,195	0,73	6,07	90,24	2,96	1,66
	Maltosa (10 %)	0,489	0,97	7,66	88,41	2,96	1,73
	Glicina (250 mmol/L)	0,242	1,37	7,05	88,64	2,94	1,94
	L-Prolina (250 mmol/L)	0,183	0,99	4,90	91,17	2,94	2,25
	Polisorbato 80 (0,02 %)	0,166	1,25	7,14	88,75	2,86	1,94
	Ninguno	0,165	1,29	7,54	88,30	2,87	1,94
40 °C	Glicina (400 mmol/L)	0,241	3,79	10,42	83,47	2,32	3,77
	L-Prolina (400 mmol/L)	0,213	4,47	7,09	85,96	2,48	3,54
	L-Isoleucina (200 mmol/L)	0,488	4,88	9,67	83,27	2,18	3,87
	L-Metionina (200 mmol/L)	0,174	5,93	7,46	84,08	2,53	3,87
	L-Valina (250 mmol/L)	0,207	6,46	9,58	81,53	2,41	3,71
pH 5,3							
Temp. de incub.	Aditivo	Absorbancia	HPLC				anti-HBs
		350-500 nm	Agregados	Dímeros	Monómeros	Fragmentos	
			%	%	%	%	IU/mL
37 °C	D(-)Manitol (10 %)	0,179	1,39	10,49	85,62	2,50	1,84
	Sacarosa (10 %)	0,185	0,61	8,46	88,36	2,57	1,88
	Maltosa (10 %)	0,516	0,76	11,04	85,51	2,69	1,70
	Glicina (250 mmol/L)	0,263	0,98	9,09	87,59	2,34	1,92
	L-Prolina (250 mmol/L)	0,195	0,78	7,34	89,58	2,30	2,20

(continuación)

	Polisorbato (0,02 %)	80	0,196	0,94	9,56	86,94	2,56	1,91
	Ninguno		0,177	0,93	10,13	86,40	2,53	1,90
40 °C	Glicina mmol/L)	(400	0,336	2,82	12,75	82,43	2,00	3,92
	L-Prolina mmol/L)	(400	0,235	2,49	9,54	85,90	2,07	4,02
	L-Isoleucina mmol/L)	(200	0,275	4,14	11,06	82,76	2,04	3,73
	L-Metionina mmol/L)	(200	0,207	3,21	9,67	84,42	2,71	3,58
	L-Valina mmol/L)	(250	0,253	4,26	12,00	81,30	2,44	3,93
pH 6,8								
Temp. de incub.	Aditivo		Absorbancia	HPLC				anti-HBs
			350-500 nm	Agregados	Dímeros	Monómeros	Fragmentos	
				%	%	%	%	IU/mL
37 °C	D(-)Manitol (10 %)		0,300	4,94	12,14	80,25	2,67	1,61
	Sacarosa (10 %)		0,270	0,95	12,19	84,16	2,70	1,89
	Maltosa (10 %)		1,008	5,96	16,81	74,46	2,77	1,34
	Glicina mmol/L)	(250	0,807	1,19	12,34	84,39	2,08	1,87
	L-Prolina mmol/L)	(250	0,328	1,10	10,89	85,87	2,14	1,90
	Polisorbato (0,02 %)	80	0,308	1,50	13,85	81,74	2,92	1,60
	Ninguno		0,344	1,40	13,68	81,91	3,00	1,73
40 °C	Glicina mmol/L)	(400	1,063	3,00	16,61	78,08	2,32	3,72
	L-Prolina mmol/L)	(400	0,550	2,89	13,95	80,69	2,47	3,61

ES 2 398 241 T5

(continuación)

	L-Isoleucina (200 mmol/L)	0,840	4,47	15,38	77,77	2,38	3,87
	L-Metionina (200 mmol/L)	0,687	2,96	13,68	79,79	3,57	3,66
	L-Valina (250 mmol/L)	1,083	4,62	15,16	75,33	4,89	3,13

REIVINDICACIONES

1. Una preparación de inmunoglobulina estable, en la que la preparación contiene prolina y en la que la preparación tiene un pH de 4,2 a 5,4 y en la que la preparación no contiene nicotinamida.
2. La preparación de la reivindicación 1, en la que contiene prolina a una concentración final de al menos 0,2 M.
- 5 3. La preparación de la reivindicación 1, en la que la concentración final de prolina es entre 0,2 y 0,4 M.
4. La preparación de la reivindicación 1 a 3, en la que la prolina es L-prolina.
5. La preparación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que tiene un pH de 4,5 a 5,2.
6. La preparación de la reivindicación 5, en la que tiene un pH de 4,6 a 5,0.
7. La preparación de la reivindicación 6, en la que contiene prolina a una concentración final de 0,25 M.
- 10 8. La preparación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que su concentración de inmunoglobulina es entre 5 y 25 % p/v.
9. La preparación de la reivindicación 8, en la que su concentración de inmunoglobulina es entre 15 y 20 % p/v, para administración subcutánea.
- 15 10. La preparación de la reivindicación 8, en la que su concentración de inmunoglobulina es entre 6 y 15 % p/v, para administración intravenosa.
11. La preparación de la reivindicación 10, en la que su concentración de inmunoglobulina es entre 8 y 12 % p/v.
12. La preparación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la preparación es una preparación de IgG, IgA o IgM.
- 20 13. Una composición farmacéutica que comprende la preparación de inmunoglobulina de una de las reivindicaciones precedentes y aditivos farmacéuticamente aceptables.
14. Un procedimiento de estabilización de las preparaciones de inmunoglobulina policlonal líquida, que comprende proporcionar una solución acuosa de inmunoglobulina y agregarle prolina, en el que el pH de la solución se ajusta a un pH de alrededor de 4,2 a 5,4 y en el que la prolina no se usa en combinación con nicotinamida.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que el pH se ajusta a 4,8.
- 25 16. El procedimiento de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que la concentración de prolina se ajusta entre 0,2 y 0,4 M.

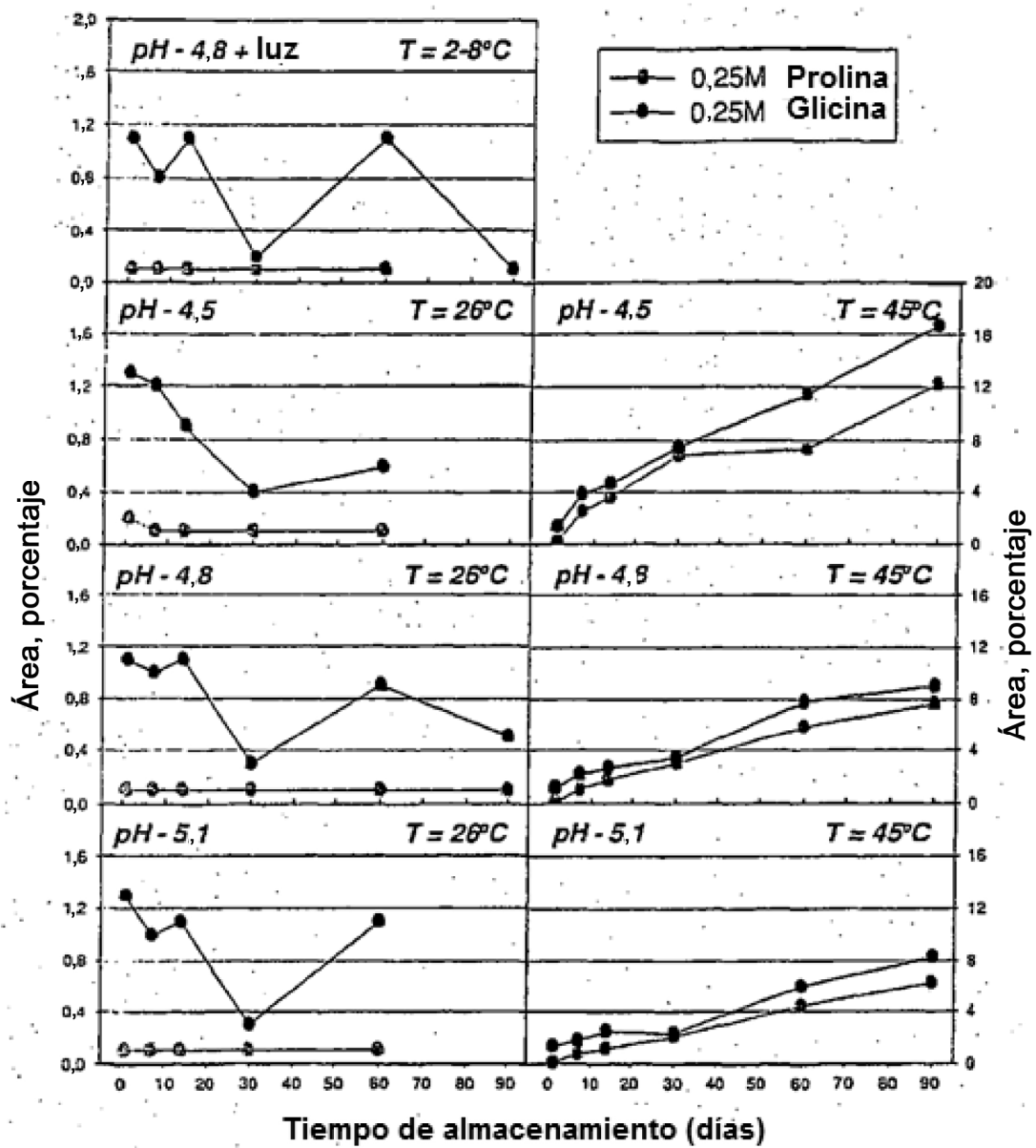


Figura 1

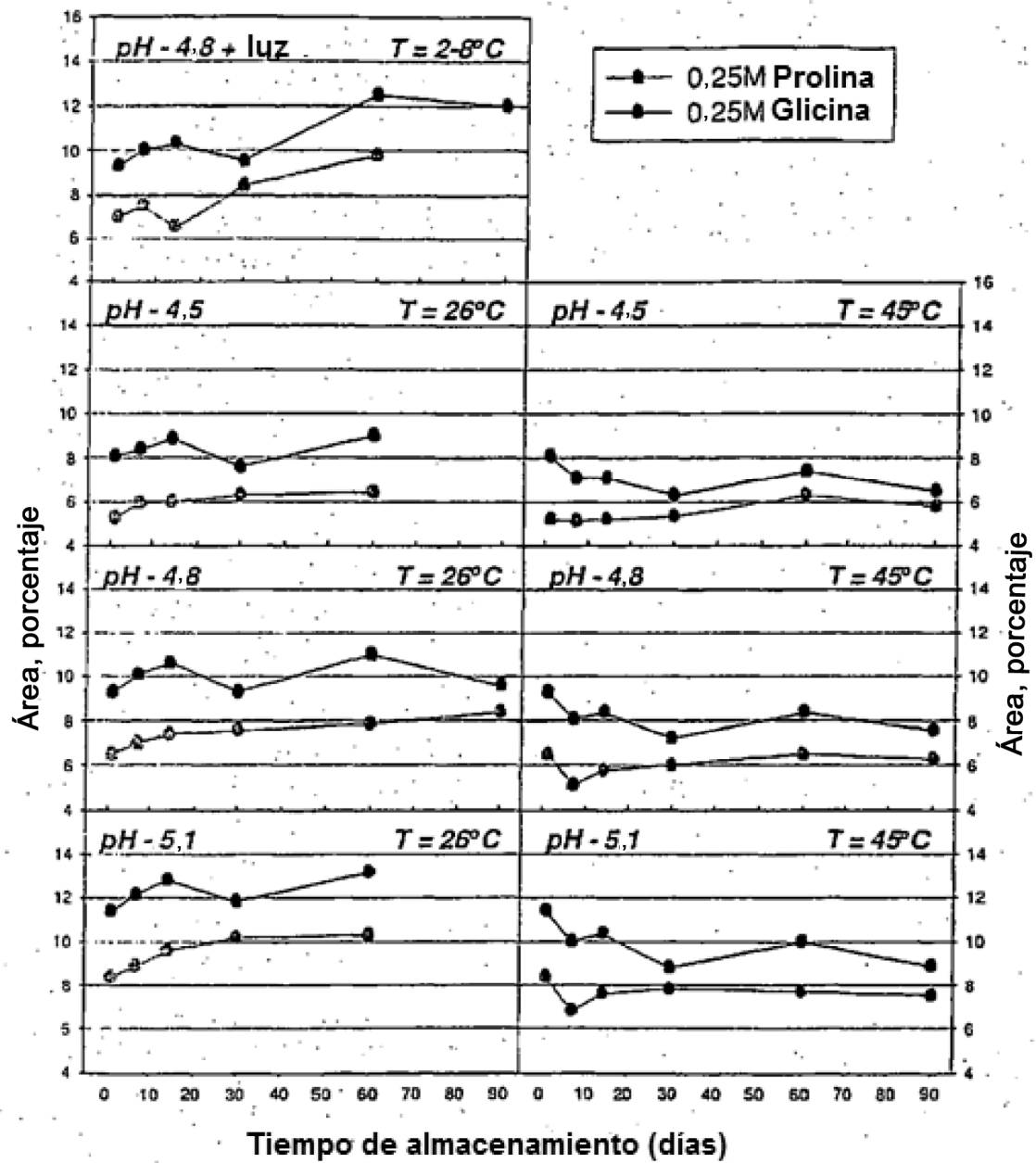


Figura 2

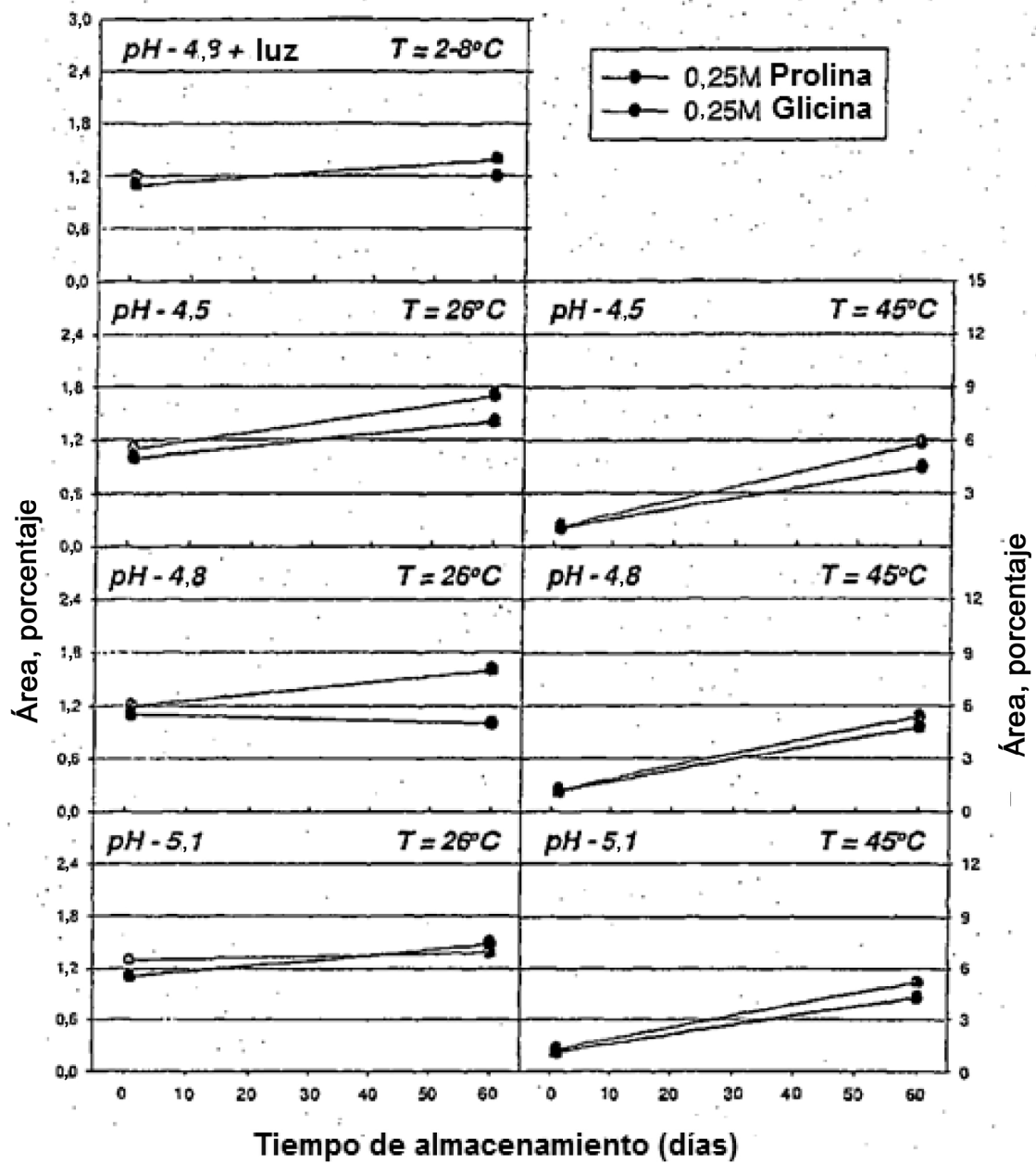


Figura 3

0.0.1

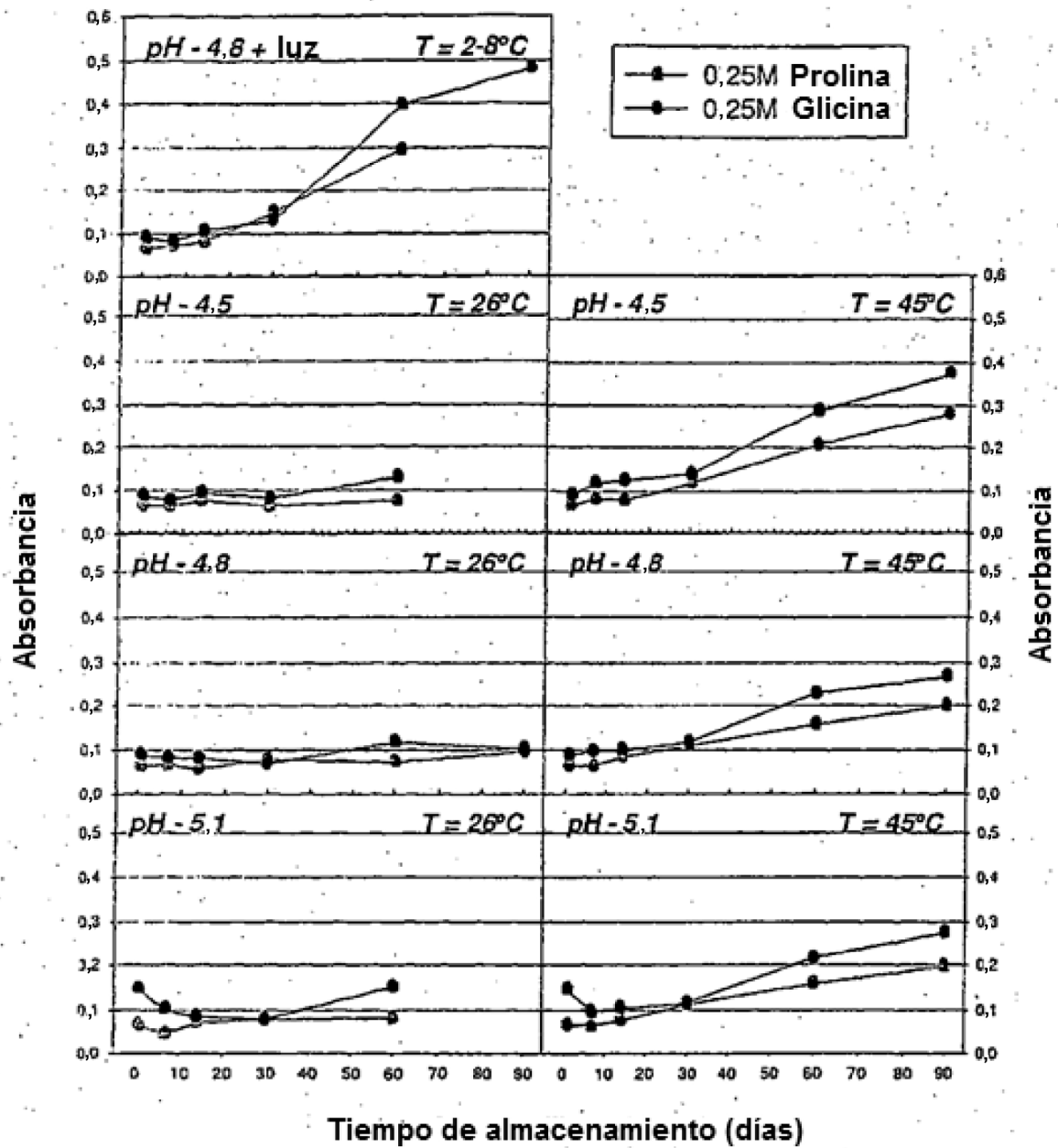


Figura 4