

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 930**

51 Int. Cl.:
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 14/765 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06800767 .3**
96 Fecha de presentación: **04.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1928915**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

54 Título: **Preparación de inmunoglobulina intravenosa de rendimiento ultra-alto**

30 Prioridad:
01.09.2005 US 217956
22.09.2005 US 232527

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2012

73 Titular/es:
PLASMA TECHNOLOGIES LLC
4 NICKLAUS LANE
KIAWAH ISLAND, SC 29455, US

72 Inventor/es:
ZURLO, Gene;
CURTIN, Dennis y
LOUDERBACK, Allan

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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).

ES 2 384 930 T3

DESCRIPCIÓN

Preparación de inmunoglobulina intravenosa de rendimiento ultra-alto

Preparación**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere generalmente a procedimientos para la purificación de inmunoglobulinas del suero y más particularmente a procedimientos para la separación libre de alcohol de inmunoglobulina de plasma sanguíneo u otro material basado en sangre.

Antecedentes y descripción de la técnica relacionada

- 10 Comúnmente, los procedimientos contemporáneos para la separación de inmunoglobulinas (IgG) de plasma sanguíneo u otro material basado en sangre dependen del trabajo anterior de Edwin J. Cohn como se ha encontrado en la patente de EE.UU. 5.177.194 concedida el 5 de enero de 1993 a Maria E. Sarno, y col. (SARNO), "Un esquema en el uso generalizado es el procedimiento de fraccionamiento bien conocido de Cohn que se basa en la precipitación diferencial usando etanol frío". Cohn y col. J. Am Chem. Soc. 68, 459 (1946).

- 15 La patente de EE.UU. 2.390.074 concedida el 4 de diciembre de 1945 a Edwin J. Cohn (Cohn) desveló el uso de alcohol, acetona y dioxano como precipitantes en tales procedimientos de fraccionamiento. La dependencia continuada del alcohol como precipitante se ha demostrado adicionalmente en la patente de EE.UU. 6.893.639 B2 concedida el 17 de mayo de 2005 a Joshua Levy y col. (Levy), en la que se establece "Los procedimientos industriales convencionales de purificación de inmunoglobulinas a partir de plasma sanguíneo se basan en el fraccionamiento con etanol frío que co-precipita grupos de proteínas basándose en sus puntos isoelectrónicos a la concentración de alcohol dada a temperaturas bajo cero".

El trabajo de Cohn se estimuló por la necesidad de las fuerzas armadas de una disolución estable para su uso como expansor del volumen del plasma durante la Segunda guerra mundial para sustituir el plasma liofilizado. Por consiguiente, el procedimiento de Cohn se basó en optimizar el procedimiento para separar la fracción de albúmina que proporciona la osmolalidad necesaria para la expansión del volumen del plasma.

- 25 Aún así, el uso de precipitantes de alcohol carece de dificultades, como se ilustra por Cohn, "Algunos precipitantes de proteínas tales como alcohol tienen una tendencia a desnaturalizar muchas proteínas con las que se ponen en contacto, aumentando el peligro de la desnaturalización con la concentración del alcohol y el aumento en la temperatura. Para muchas proteínas se ha encontrado aconsejable ejercer un cuidado considerable en la mezcla del precipitante con el plasma u otra disolución de proteínas con el fin de evitar la desnaturalización de la proteína". Por este motivo se considera prudente proporcionar un procedimiento libre de alcohol para el fraccionamiento de plasma sanguíneo y otro material basado en sangre, que incluya la purificación de IgG.

- 30 Otras consideraciones de combinar etanol y agua pueden garantizarse con respecto a la desnaturalización de proteínas. Por ejemplo, si se añaden 500 ml de etanol (100%) a 500 ml de agua, no se obtienen 1000 ml de etanol al 50%. Más bien, el volumen final es aproximadamente 956 ml. Se supone que la reducción en volumen es debida a una estrecha unión entre el etanol y las moléculas del agua. Tal unión puede ser una causa de cambios en la configuración de las proteínas, produciendo alguna desnaturalización permanente de moléculas de proteína que sigue después de que el etanol se elimine y el agua se devuelva.

- 40 En los años 70 se encontró que la cromatografía era útil en la separación y purificación de proteínas del plasma. La cromatografía separa proteínas del plasma eligiendo específicamente como diana características únicas de cada una que incluyen tamaño molecular (filtración en gel), carga (cromatografía de intercambio iónico) e interacciones conocidas con moléculas específicas (cromatografía de afinidad).

- 45 El uso de diversos procedimientos cromatográficos a escala industrial se ha adaptado para el aislamiento de proteínas de alto valor de pequeño peso tales como el factor VIII, de plasma, y para la purificación final de gamma-globulina después de la separación del plasma por metodologías de Cohn o de Cohn modificadas. Sin embargo, no se ha encontrado práctica la separación cromatográfica de las fracciones de menor valor de gran peso tales como albúmina y gamma-globulina a escala industrial.

- 50 Dos solicitudes de patente de EE.UU., presentadas por Edward Shanbrom, que tienen los números de solicitud 20030022149 (Shanbrom '149) y 20030129167 (Shanbrom '167) presentadas el 30 de enero de 2003 y el 10 de julio de 2003, respectivamente, enseñan el uso de sales carboxílicas (por ejemplo, citrato de trisodio) como agente para potenciar la formación de un crioprecipitado de plasma. El (Los) procedimiento(s) de Shanbrom implica(n) generalmente citrato de trisodio y otras sales de citrato como agentes para potenciar la producción de factores de coagulación de la sangre partir del crioprecipitado.

Shanbrom '149 enseña en el párrafo 0009 que "Es un objeto de la presente invención proporcionar rendimientos potenciados de crioprecipitado". Shanbrom también enseña en el párrafo 0011 que los ácidos carboxílicos son

agentes eficaces para potenciar la producción de factores de coagulación de la sangre a partir del crioprecipitado. Shanbrom '149 observa que la adición de citrato a plasma, especialmente a concentraciones entre el dos y el diez por ciento en peso, no desnaturaliza apreciablemente proteínas lábiles. Además, en Shanbrom '149 se observa que el citrato potencia o mejora la destrucción de microorganismos por tratamiento térmico.

- 5 Shanbrom '167 observa en el párrafo 0015 que "No sólo el citrato añadido aumenta la cantidad de crioprecipitado, simplifica el procedimiento disminuyendo el requisito de congelar ..." plasma con el fin de recoger el crioprecipitado. Shanbrom enseña claramente el uso de la producción de un crioprecipitado con el fin de fraccionar productos del crioprecipitado mediante el uso de citrato de trisodio en concentraciones del dos al diez por ciento.

- 10 Mientras que Shanbrom '149 y '167 tratan directamente de extraer productos de coagulación lábiles de un crioprecipitado formado usando compuestos de citrato, particularmente citrato de trisodio, y de destruir los microorganismos en el crioprecipitado usando los compuestos de citrato, la presente invención trata directamente de extraer productos no lábiles (por ejemplo, albúmina, gamma-globulina y alfa-1-antitripsina) de un sobrenadante formado usando compuestos de sal. Shanbrom ni enseña ni trata de ningún modo el uso de un sobrenadante.

- 15 En los años 50, se descubrió que un "crioprecipitado" derivado de materia basada en sangre contenía diversos factores que eran útiles en el tratamiento de trastornos de la coagulación tales como hemofilia. Se obtuvo un crioprecipitado tal, como el nombre implica, congelando plasma sanguíneo seguido de descongelación controlada a cero a cuatro grados centígrados para formar una suspensión líquida del precipitado. Entonces, un sobrenadante derivado del procedimiento de crioprecipitación estuvo disponible para el fraccionamiento usando procedimientos según Cohn para producir albúmina y gamma-globulina. Desarrollos posteriores condujeron al fraccionamiento del
20 crioprecipitado en concentrados puros del factor VIII, factor von Willebrand y otros factores de coagulación. Tal puede llevarse a cabo usando separaciones no alcohólicas y purificación cromatográfica.

Breve resumen y objetos de la invención

- 25 En breve resumen, esta presente invención proporciona procedimientos novedosos y eficaces de aislar gamma-globulina de plasma y formularla en una preparación inyectable intravenosa. Por consiguiente, la presente invención, que puede definirse que es "una preparación de inmunoglobulina intravenosa de rendimiento ultra-alto" consigue rendimientos mayores de una gamma-globulina de calidad superior separando directamente y rápidamente la gamma-globulina del plasma por medio de un citrato de sodio precipitante no desnaturalizante. Una característica sorprendente del uso de esta sal es que el fraccionamiento depende de emplear una disolución de porcentaje en peso eficaz.

- 30 Por tanto, la adición de esta sal a la proteína en disolución demuestra ser no tan reactiva para la eliminación de agua como la adición de etanol por procedimientos previos. Un rápido aislamiento usando esta eliminación de sal del agua como adición de etanol por procedimientos previos. Un rápido aislamiento usando la eliminación de la fracción resultante seguida de la eliminación de sal de la fracción resultante y una rápida restauración de la molécula de agua interna de la proteína ha demostrado ser superior para el fraccionamiento de etanol usando procedimientos
35 actualmente empleados.

El procedimiento inventivo es para fraccionar productos basados en sangre para producir un producto de inmunoglobulina no desnaturalizada útil (algunas veces denominada en lo sucesivo IgG) como se define en la reivindicación 1.

- 40 La separación de los productos puede llevarse a cabo por centrifugación o procedimientos existentes que son muy conocidos en las ciencias químicas.

Sorprendentemente, la precipitación usando sal no parece ser dependiente de ningún tipo de reacción molar. Más bien, la precipitación parece basarse en una simple relación en porcentaje en peso. En la siguiente tabla (Tabla I) se encuentran concentraciones eficaces.

Tabla I - Ejemplos de concentración eficaz de sal

Sales orgánicas	Peso molecular	Peso molar en una disolución al 12% (para la etapa (a))	Peso molar en una disolución al 22% (para la etapa (b))
Citrato de sodio	294	0,408 M	0,748 M

- 45 En la etapa (h) puede usarse un sistema de diafiltración con una membrana de filtración de 30 KD para separar la sal seleccionada y el agua en exceso del producto resultante para permitir el procesamiento adicional a escala industrial. Obsérvese que tal filtración se hace fácil y posible extrayendo euglobulinas del sobrenadante. Como se usa en este documento, las euglobulinas se definen como aquellas globulinas que son insolubles en agua, pero que son solubles en soluciones salinas. Y, lo que es más importante, si las euglobulinas no se eliminan de una disolución
50 y si la fuerza iónica de esa disolución se reduce hacia la del agua desionizada (por ejemplo, en el caso de la presente invención), las euglobulinas contaminan un sistema de diafiltración, convirtiéndolo así en inutilizable.

Es muy sabido que el citrato de sodio se ha usado durante mucho tiempo a bajas concentraciones durante la recogida, preservación y almacenamiento de plasma sanguíneo. La posterior diafiltración después del uso de altas concentraciones de citrato de sodio como precipitante reduce sustancialmente la fuerza iónica y el volumen de la disolución de gamma-globulina, permitiendo el logro de la purificación cromatográfica a escala industrial.

- 5 Tras la separación de gamma-globulina de plasma por este procedimiento, la albúmina y la alfa-1-antitripsina pueden eliminarse posteriormente de las proteínas restantes mediante procedimientos disponibles de Cohn u otros. El procedimiento según la presente invención permite la separación de gamma-globulina sin exponerla a los efectos desnaturizantes del etanol usado en el procedimiento de Cohn, dejando así la gamma-globulina en un estado nativo. Los efectos desnaturizantes del alcohol incluyen formación de polímeros, agregados y fragmentos de la molécula de gamma-globulina. Sin embargo, el uso de sal estabiliza el plasma, a la vez que provoca la precipitación de sustancialmente todas las proteínas de coagulación, previniéndose así la generación de activadores de enzimas y enzimas proteolíticas.

- 10 La ausencia de los efectos desnaturizantes del etanol, la estabilización del plasma con la sal y la posterior eliminación de proteínas de coagulación por medio de la sal produce una preparación de gamma-globulina que tiene actividad anticomplementaria muy baja.

- 15 En resumen, el procedimiento de la presente invención emplea altas concentraciones de sal combinada con la posterior eliminación de esta sal del concentrado de gamma-globulina por medio de diafiltración, una técnica que se volvió práctica en los años 80. Entonces, la purificación final de la gamma-globulina resultante se consigue prácticamente y eficazmente mediante el uso de técnicas cromatográficas de purificación bien establecidas. La invención reduce los costes de producción como resultado de mayores rendimientos, menos etapas de fraccionamiento, tiempo de procesamiento global más corto, menores costes de energía y menores costes de productos químicos. Los costes de capital son menos debido a requisitos de espacio reducidos, reducido trabajo en proceso, tiempo de procesamiento reducido y eliminación de los entornos a prueba de explosiones requeridos para el procesamiento del etanol.

- 20 Por consiguiente, es un objeto primario proporcionar una preparación de gamma-globulina intravenosa eficaz a un coste que sea reducido a partir de los procedimientos en la práctica actual.

Por tanto, es un objeto de principios proporcionar un procedimiento libre de alcohol para preparar gamma-globulina.

Es un objeto importante proporcionar un procedimiento tal y preparación que sea de alto rendimiento.

- 30 Otro objeto es proporcionar una preparación de gamma-globulina que pueda infundirse rápidamente con mayor tolerancia por el paciente que la gamma-globulina producida por procedimientos tradicionales empleando alcohol.

Un objeto es producir gamma-globulina que tiene formación reducida en el procedimiento de polímeros, agregados, fragmentos, activadores de enzimas y enzimas proteolíticas en comparación con preparaciones similares producidas usando procedimientos basados en alcohol tradicionales.

- 35 Otro objeto es derivar un crioprecipitado para formar una suspensión líquida de un crioprecipitado a partir del cual, mediante fraccionamiento, puedan producirse factor VIII, factor von Willebrand y otros factores de coagulación.

Estos y otros objetos y características de la presente invención serán evidentes de la descripción detallada tomada con referencia a los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

- 40 La Figura 1 es un diagrama de flujo de un conjunto crítico de etapas iniciales asociadas al procedimiento según la presente invención.
La Figura 2 es un diagrama de flujo que desvela una serie de etapas que siguen inmediatamente a las etapas vistas en la Figura 1.
La Figura 3 es un diagrama de flujo que desvela aquellas etapas de procedimiento que siguen inmediatamente a las etapas vistas en la Figura 2.
45 La Figura 4 es un diagrama de flujo que desvela etapas que siguen inmediatamente a las etapas vistas en la Figura 3 para proporcionar un producto útil.

Descripción detallada de las realizaciones ilustradas

- Ahora se hace referencia a los elementos de paso de flujo ilustrados en las Figuras 1-4. Generalmente, cada caja rectangular se usa para ilustrar una etapa de procedimiento; cada diamante se usa para demostrar una etapa de separación; cada cilindro elíptico designa un producto resultante de una etapa de procedimiento o de separación precedente; y cada círculo se usa para identificar tanto un punto de partida como un punto de paso de continuación fuera de la hoja.

Ahora se hace referencia a la Figura 1, en la que se observa una porción 10-1 inicial de un paso de flujo del procedimiento de IgG preferido, generalmente numerado 10. Como se indica después del punto 20 de partida inicial,

un volumen de plasma 30 que va a procesarse se selecciona para el procesamiento. Debe observarse que mientras que el plasma 30 se usa, por ejemplo, en esta descripción de una realización ilustrada, otros productos basados en sangre pueden procesarse dentro del alcance de la presente invención. Por tanto, después de la preparación para su uso se usa una etapa 42 de separación para separar una pasta 44 del plasma 50 crioempobrecido preparado como se desvela en más detalle más adelante en este documento.

Se selecciona una cantidad de una sal (que se selecciona de la sal enumerada en la Tabla I, proporcionada arriba) para la adición al plasma 50 por el procedimiento 52. Generalmente, una sal puede prepararse en disolución, añadirse como sal seca o añadirse como una combinación de sales hidratadas y secas (procedimiento 54). En cualquier caso, lo más importante es llevar la concentración total de sal añadida a una concentración predeterminada en peso.

Como se selecciona y se usa citrato de sodio, se prepara una disolución al cincuenta por ciento de citrato de sodio mediante agitación de quinientos gramos de citrato de sodio en seiscientos mililitros de agua purificada. El tiempo de agitación debe ser de treinta a sesenta minutos o, alternativamente, hasta que se disuelva el citrato de sodio. En este momento, diluir la mezcla con agua pura hasta mil mililitros. Añadir disolución al 50% de ácido cítrico a la mezcla hasta que se alcance un pH de 7,0.

Como es muy conocido en las ciencias de la química orgánica, las siguientes etapas pueden usarse para producir una disolución al cincuenta por ciento de ácido cítrico. Añadir 50 g de ácido cítrico a 60 ml de agua purificada. El tiempo de agitación debe ser aproximadamente 30 minutos o hasta que el ácido cítrico esté en disolución. Después de que el ácido cítrico esté en disolución, añadir agua purificada suficiente para llevar el volumen a 100 ml y mezclar bien. Una parte de esta disolución, añadida a los 1000 ml de citrato de sodio, ajusta el pH a 7,0. Por tanto, añadir el ácido cítrico a la disolución de citrato de sodio hasta que se alcance el pH de 7,0. Debe observarse que necesita añadirse muy poco ácido cítrico para ajustar a un pH de 7,0.

Antes de realizar la primera etapa de fraccionamiento (procedimiento 54 para citrato de sodio) se calcula un volumen de disolución de fraccionamiento que va a añadirse al plasma 50. Es un objetivo que la concentración de sales (en este caso disolución de fraccionamiento de citrato de sodio) deba ser el doce por ciento en peso. Por tanto, el pH de la disolución de fraccionamiento debe ser aproximadamente 7,0.

La fórmula (Fórmula I) para calcular los volúmenes respectivos de disolución de fraccionamiento (citrato de sodio) y plasma 50 son del siguiente modo:

$$x = (C * V) / (0,5 - C)$$

en la que:

x es el volumen deseado de disolución al 50% de citrato de sodio;

C es una concentración fraccionaria deseada en peso de citrato de sodio; (por ejemplo, 0,12 o el doce por ciento); y

V es el volumen de disolución que va a diluirse (por ejemplo, volumen de plasma 50). Un ejemplo de un cálculo por la Fórmula I es:

Para un volumen (V_p) de plasma 50 de 500 litros, y la concentración fraccionaria deseada en peso de citrato de sodio es el doce por ciento:

$$x = (0,12 * 500) / (0,5 - 0,12) = 158 \text{ litros}$$

Resolviendo la Fórmula I para C da la Fórmula II en la que los valores de volúmenes de plasma 50 y citrato de sodio pueden insertarse del siguiente modo:

$$C = (0,500 * 158) / (500 + 158) = 0,12$$

Para el procedimiento 54, durante un periodo de aproximadamente cinco minutos, añadir la disolución de fraccionamiento de citrato de sodio preparada (que puede ser a temperatura ambiente, es decir, a aproximadamente veinte grados centígrados) al plasma 50, que tiene una temperatura inicial de cinco grados centígrados. Agitar suavemente a la vez que se añade la disolución de citrato de sodio. Una vez se ha añadido completamente la disolución de citrato de sodio al plasma 50, continuar agitando suavemente la suspensión resultante durante aproximadamente sesenta minutos a la vez que se reduce la temperatura de suspensión a dentro de un intervalo de dos a ocho grados centígrados (la suspensión debe mantener el pH a aproximadamente 7,0 a 7,1).

Tras completarse el procedimiento 54, centrifugar como el procedimiento 56. Se recomienda usar una centrífuga de flujo continuo (por ejemplo, una centrífuga Westphalia) para separar partes de componentes de la suspensión en un líquido 60 sobrenadante y una pasta 62 por procedimientos normales para aquellos expertos en la materia, a la vez que se mantiene la temperatura de la suspensión en el intervalo de dos a ocho grados centígrados.

Mientras que el líquido 60 sobrenadante, que contiene prácticamente toda la IgG del plasma original, se retiene durante el procesamiento adicional como una parte integral del presente procedimiento inventivo, la pasta 62 puede procesarse adicionalmente para recuperar factores sanguíneos que incluyen los factores VIII, IX, von Willebrand y fibrinógeno.

- 5 Para la segunda fase de fraccionamiento usando citrato de sodio, realizar la etapa de procedimiento 64 que añade disolución de fraccionamiento de citrato de sodio adicional al líquido 60 sobrenadante. Se añade suficiente citrato de sodio al cincuenta por ciento al líquido 60 para aumentar la concentración en peso de citrato de sodio del doce por ciento al veintidós por ciento. Obsérvese que, para otra sal o sales usadas en la etapa 64, la concentración total en peso de la al menos una sal usada debe estar en un intervalo del veintiuno al veintitrés por ciento, preferentemente en el intervalo del veintidós por ciento.

Para calcular el volumen de citrato de sodio al cincuenta por ciento que va a añadirse se proporciona la Fórmula III del siguiente modo:

$$C_e = ((V_{60} * C_{60}) + (V_x * C_{0,50})) / (V_{60} + V_x)$$

- 15 en la que C_e es la concentración final deseada en peso de citrato de sodio; V_{60} es el volumen de líquido 60 sobrenadante; C_{60} es la concentración de citrato de sodio en el líquido 60 sobrenadante; V_x es el volumen de citrato de sodio al cincuenta por ciento que va a añadirse; y $C_{0,50}$ es la concentración de citrato de sodio al cincuenta por ciento (es decir, 0,50).

Obsérvese que la concentración final deseada en peso de citrato de sodio en disolución es 0,22 o el veintidós por ciento.

- 20 Resolviendo para V_x da la Fórmula IV que puede usarse para calcular el volumen de citrato de sodio que va a añadirse:

$$V_x = V_{60} * (C_e - C_{60}) / (C_{0,50} - C_e)$$

Como un ejemplo, para un volumen de V_{60} de 552 litros; una concentración en peso de C_e de 0,22; una concentración en peso de 0,12 para C_{60} ; y una concentración en peso de 0,50 para $C_{0,50}$:

- 25 **$V_x = 197$ litros**

Después de añadir el volumen V_x de citrato de sodio, agitar durante dos a cuatro horas (de una a dos horas es frecuentemente suficiente para volúmenes más pequeños), a la vez que se retiene la temperatura de esta mezcla entre dos y ocho grados centígrados. Obsérvese que esta disolución cambiará de color a un amarillo pálido cuando se añada citrato de sodio adicional y la mezcla se agite.

- 30 Después de agitar, por la etapa 66, centrifugar la mezcla, usar una centrífuga de flujo continuo a la vez que se mantiene la temperatura en el intervalo de dos a ocho grados centígrados para separar la pasta 70 del sobrenadante 72. El sobrenadante resultante (sobrenadante 72) no contiene esencialmente IgG. Prácticamente toda la IgG de plasma 50 se encuentra ahora en la pasta 70.

- 35 Ahora se hace referencia a la Figura 2 ya que el punto 80 continúa con el punto 80' para la porción 10-2 de paso de flujo del paso 10 de flujo. El contenido de pasta 70 incluye IgG, otras proteínas del suero y citrato de sodio. El citrato de sodio debe eliminarse de la pasta 70 para permitir aislar la IgG por cromatografía de intercambio iónico. Primero, la pasta 70 se licúa usando agua purificada (de aproximadamente cuatro veces el volumen de la pasta 70) como etapa 90. El producto de la etapa 90 es una disolución 100 rica en IgG. La conductividad inicial de la disolución 100 es aproximadamente 20 miliSiemens/centímetro (mS/cm).

- 40 La eliminación del citrato de sodio se lleva a cabo por diafiltración continua usando agua purificada como disolvente en la etapa 102 que separa la disolución 100 en citrato 110 de sodio eliminado y concentrado 112 de IgG desalado. Obsérvese que esta etapa debería realizarse coherentemente, independientemente de la al menos una sal seleccionada. La completitud de la etapa 102 se indica cuando la conductividad del concentrado 112 se reduce a 100-900 microSiemens/centímetro (uS/cm). Para la diafiltración en la etapa 102 puede emplearse un sistema de diafiltración Millipore (o comparable) equipado con membranas de 30 KD de corte.

- 45 La inactivación vírica del concentrado 112 rico en IgG, asociada a la etapa 120, puede llevarse a cabo como una etapa de inactivación vírica doble que implica un primer procedimiento de disolvente/detergente (S/D), seguido de un procedimiento S/D aumentado. El primer procedimiento emplea elevar la temperatura del concentrado 112 a aproximadamente veintisiete grados centígrados (la temperatura puede oscilar de veinticuatro a treinta grados centígrados). Entonces se añade un volumen suficiente de Triton X-100 o Tween 80 para preparar una disolución al uno por ciento y fosfato de tri-N-butilo suficiente para preparar una disolución de tres décimos de la del uno por ciento para preparar una primera mezcla de S/D añadida. El primer procedimiento continúa incubando la primera mezcla de S/D añadida a veintisiete grados centígrados durante tres horas, tiempo durante el cual se inactivan los virus envueltos por lípidos. A partir de este punto pueden emplearse procedimientos de inactivación y

fraccionamiento actualmente disponibles. Sin embargo, un procedimiento actualmente preferido se proporciona después en este documento para completarlo.

Para la etapa 120, un concentrado de S/D puede prepararse del siguiente modo:

- 5 Añadir 30 mililitros de fosfato de tri-N-butilo a 800 mililitros de agua purificada. Mezclar bien. Añadir 100 mililitros de tanto Triton X-100 como Tween 80 a la disolución mezclada. De nuevo, mezclar bien para proporcionar una disolución de S/D mezclada final. Añadir suficiente agua purificada para llevar el volumen total de la disolución mezclada final a 1000 mililitros. Mezclar bien otra vez. Así hecha, la disolución final es un concentrado 10x. Añadir 100 mililitros de este concentrado a cada 900 mililitros del concentrado 112 para formar la primera mezcla de S/D añadida
- 10 Después de tres horas de incubación, añadir a la disolución resultante del primer procedimiento de S/D suficiente formaldehído para preparar tres décimos de disolución al uno por ciento y fenol suficiente para preparar tres décimos de disolución al uno por ciento para formar una mezcla aumentada para empezar la fase de procedimiento aumentado de la etapa 120. Incubar a aproximadamente veintisiete grados durante tres horas adicionales, después de cuyo tiempo se inactivan los virus sin envolver y envueltos.
- 15 Para la etapa 120, un concentrado "aumentado" puede prepararse del siguiente modo:

 Añadir 13,4 mililitros de treintaisiete y medio por ciento de disolución de formaldehído a 900 mililitros de agua purificada. Mezclar bien. Añadir cincuenta gramos de fenol (calidad de reactivo) a esta mezcla. De nuevo mezclar bien. Añadir suficiente agua purificada para llevar el volumen total de la preparación "aumentada" a mil mililitros. Una vez más, mezclar bien. Esta preparación contiene 50.000 partes por millón de cada uno de formaldehído y fenol (cinco por ciento de cada uno). Medir el volumen de la primera mezcla de S/D añadida. Añadir 167 mililitros de concentrado aumentado a cada 833 mililitros de la primera mezcla de S/D añadida para formar la mezcla aumentada
- 20

La etapa 120 se completa enfriando la mezcla aumentada procesada a una temperatura de dos a ocho grados centígrados. Así enfriada, la mezcla aumentada se convierte en la disolución 122 de virus inactivado (VI) de IgG.

- 25 Alternativamente, los virus pueden eliminarse por otros procedimientos (por ejemplo, cromatografía, nanofiltración, pasteurización), si se desea.

La etapa 124 implica el uso de cromatografía en columna para eliminar los productos químicos de la inactivación vírica. Esto puede llevarse a cabo por las siguientes subetapas:

- 30 1. Fijar una columna ancha corta con la resina Toyopearl CM-650C. La resina Toyopearl es una resina de intercambio catiónico débil usada para capturar IgG en disolución 122, a la vez que permite que otras proteínas de la disolución 122 pasen a través de la columna. Es importante que la conductividad de la disolución 122 esté en un intervalo de 100 a 900 microSiemens/centímetro (uS/cm) (es preferible que tal conductividad esté en un intervalo de 400 a 600 micro-Siemens/centímetro). La IgG del plasma 50 se une a la resina de intercambio en la disolución de baja fuerza iónica.
- 35 2. Introducir la disolución 122 en la resina de intercambio a una baja velocidad. Recoger el efluente líquido de la columna y medir el efluente líquido a 280 nanómetros en una cubeta de sílice de un centímetro en un espectrofotómetro de alta calidad (como ejemplo puede usarse un Beckman DU-7 con una fuente de luz de deuterio). Debe observarse que la densidad óptica del efluente aumentará a medida que las proteínas se introducen en la columna de resina. El fenol en la disolución de inactivación vírica (si se usa) también puede aumentar la densidad óptica medida. Después de que toda la disolución 122 haya pasado por la columna de resina y los esterilizantes se laven de la columna empieza la recogida del efluente cuando la densidad óptica medida aumenta de su valor original. Un aumento en la densidad óptica es indicativo de proteína en el efluente. Después de un periodo, la densidad óptica cae a un nivel que es indicativo de poca o ninguna proteína en disolución. En esto momento puede cesar la recogida. En este momento es preferible lavar minuciosamente la resina con agua desionizada. El material unido es IgG, identificada a lo largo del paso 10-2 como IgG 130 unida. El efluente recogido de la columna incluye toda la proteína del plasma 50, excepto la IgG. Este efluente es disolución 132 de efluente. Se recomienda realizar electroforesis de la proteína del suero en la disolución 132 de efluente para confirmar que poca o ninguna IgG se ha liberado en la disolución 132.
- 45
- 50 Dependiendo del tamaño de la columna de resina, preparar un volumen de la disolución al dos por ciento de cloruro sódico. La aplicación del cloruro sódico se usa para efectuar la liberación de la IgG unida de las partículas de la resina. Como es muy conocido en la ciencia química, se prepara una disolución al dos por ciento mezclando 20 gramos de cloruro sódico en un litro de agua desionizada. Debe prepararse suficiente volumen de disolución al dos por ciento de cloruro sódico para igualar aproximadamente diez veces el volumen de la columna de resina.
- 55 Para la etapa 134, añadir la disolución de cloruro sódico a la columna, recoger el efluente de la columna. Simultáneamente, medir la densidad óptica de la disolución de efluente a 280 nanómetros usando un espectrofotómetro con una cubeta de sílice de un centímetro. Se encontrará que la densidad óptica (DO) resultante

aumentará repentinamente a medida que la IgG se desacopla de la resina y se libera al efluente. Recoger toda la disolución medida a alta DO. Si la DO del efluente cae a un intervalo más bajo (normal), cesar la recogida de disolución. La disolución resultante es disolución 140 de IgG. Obsérvese que una DO alta es indicativa de contenido de proteína en disolución, y que la disolución 140 puede contener pequeñas cantidades de IgM y IgA, que requiere eliminación adicional. Además, la disolución 140 contiene cloruro sódico que debe eliminarse antes de que pueda aislarse cualquier IgG pura.

Ahora se hace referencia al punto 150 de continuación en la Figura 2 que continúa con el punto 150' de continuación en la Figura 3 para la porción 10-3 de paso de flujo del paso 10 de flujo. El cloruro sódico se elimina preferentemente de la disolución 140 por diafiltración continua empleando un sistema de diafiltración. Éste puede consistir en un sistema de diafiltración Millipore (o comparable) equipado con membranas de 30KD de corte. Como se realiza en la etapa 152, el disolvente de diafiltración es agua purificada. Como puede observarse, la conductividad inicial de la disolución 140 es aproximadamente cincuenta miliSiemens/centímetro (mS/cm). Al completarse la diafiltración, la conductividad se reduce a 100-900 microSiemens/centímetro (uS/cm).

Los productos de diafiltración son un concentrado 160 rico en IgG y cloruro 164 sódico eliminado. Se recomienda que la electroforesis del suero se realice en esta etapa en el procedimiento para confirmar las fracciones de proteína en el concentrado 160.

La etapa 166 es una etapa final para purificar el concentrado 160 rico en IgG. Para la etapa 166 se prefiere fijar una columna de resina ancha corta con resina Toyopearl QAE-550C. Tal resina proporciona un intercambio aniónico fuerte para capturar otras proteínas en el concentrado 160 rico en IgG, a la vez que permite que la IgG en disolución pase a través de la columna. Es importante que la conductividad del concentrado 160 esté en un intervalo de 100 a 900 microSiemens/centímetro, y preferentemente dentro de un intervalo de 400 a 600 microSiemens/centímetro. De este modo, la IgG en el concentrado 160 pasará a través de la columna de resina en la etapa 166 sin unirse, mientras que otras proteínas, que incluye IgM y IgA, se unirán a la resina en la columna y, por tanto, se eliminarán de la disolución. De este modo, cualquier proteína 170 residual contaminante es eficazmente separada de una disolución 172 de IgG purificada.

Como el procedimiento es continuo, se recomienda que la disolución 172 de IgG se recoja y la DO se mida a 280 nm. Recoger las disoluciones de efluente a alta DO. Si la DO medida cae, cesar la recogida. Esta disolución reunida está relativamente diluida.

La disolución reunida se concentra usando la etapa 180 por ultrafiltración. Para tal ultrafiltración puede usarse un filtro de fibra o un sistema de ultrafiltración Millipore (Pellicon) o equivalente (retención de 10K a 30K dalton) para concentrar a una disolución 182 al doce por ciento de IgG. El agua 184 en exceso se elimina en el procedimiento de la etapa 180. El concentrado del doce por ciento resultante sólo debe tener una cantidad traza de cloruro sódico y el pH debe ser aproximadamente siete. La conductividad debe medir aproximadamente 100 a 900 microSiemens/centímetro.

Para estabilizar la disolución 182 al doce por ciento de IgG, añadir (etapa 190) una disolución de maltosa o sorbitol para diluir la disolución al doce por ciento a exactamente el diez por ciento. La disolución final al diez por ciento (disolución 192 de IgG) debe contener aproximadamente el cinco por ciento de maltosa o sorbitol (sea cual sea la que se use).

Opcionalmente, para eliminar los virus 204 de la disolución 192 de IgG puede realizarse nanofiltración pasando la disolución 192 al diez por ciento por una membrana de retención de virus (etapa 200) para producir un concentrado 202 nanofiltrado.

Ahora se hace referencia al punto 210' de continuación en la Figura 4, para la porción 10-4 del paso de flujo del paso 10 de flujo, que continúa del punto 210 de continuación en la Figura 3. Como es procedimiento convencional (dependiendo de la ejecución de la etapa 200 opcional anterior), tanto el concentrado 192 de IgG estabilizado como el concentrado 202 de IgG nanofiltrado se diluye con agua desionizada en la etapa 220 para producir una disolución 222 de IgG purificada a granel. Las bacterias contaminantes pueden eliminarse pasando la disolución 222 por un filtro esterilizante en la etapa 230 para producir una disolución 232 de IgG a granel esterilizada. Las bacterias 234 contaminantes eliminadas pueden desecharse mediante procedimientos actualmente conocidos en la técnica.

La disolución 232 estéril resultante puede envasarse en viales por procedimientos convencionales en la etapa 240 para producir un lote 242 de viales de disolución 232. Según se requiera para el aseguramiento de la calidad, la prueba final y la inspección del lote 242 pueden hacerse en la etapa 244 en cooperación con la etapa 246 para producir un lote 250 de viales validados de disolución 232, eliminándose de los mismos cualquier descarte 252.

Ahora se hace referencia a la Figura 1 en la que el diagrama 10-1 de flujo desvela la etapa de separar una pasta de la que se ven otros productos, por ejemplo, factor VIII, factor von Willebrand y otros factores de clonación que pueden fraccionarse. Las etapas asociadas al producto 44 vistas en la Figura 1 son opcionales y pueden ir seguidas de la producción de un crioprecipitado del que pueden eliminarse el factor VIII, factor von Willebrand y otros factores de coagulación. En este caso, el procedimiento 40 se define para calentar gradualmente el plasma 30 de cero a cuatro grados centígrados. Tal calentamiento produce un plasma descongelado en el que un crioprecipitado se

suspende. Por la etapa 42, el plasma descongelado se centrifuga para dar el crioprecipitado en forma de una pasta 44. La pasta 44 puede separarse posteriormente y procesarse mediante procedimientos conocidos para proporcionar el factor VIII, factor von Willebrand y otros factores de coagulación. El material separado restante, llamado plasma 50 criopobrecido, se procesa como se ha desvelado arriba.

5 Resultados de un procedimiento de fraccionamiento realizado según la presente invención:

Con el fin de mostrar la eficacia y precisión de la separación de las etapas de la presente invención desveladas en este documento, los siguientes resultados, usando citrato de sodio, se han extraído de un informe de laboratorio fechado el 8 de agosto de 2005.

10 En el procedimiento se usó plasma humano congelado fresco. Como es típico en tales procedimientos, se preparó un conjunto a partir de cuatro a ocho bolsas de plasma descongelado (véase la etapa 40, Figura 1). Se usó equipo comercial disponible de Beckman-Coulter para evaluar las diversas fracciones a medida que estuvieron disponibles. Se usó el densitómetro de Beckman "Appraise" para barrer los geles de agarosa de Beckman para la electroforesis de proteínas del suero como parte de un sistema de electroforesis Paragon. Para cada fracción preparada a partir del conjunto, entre tres y cinco ranuras de gel se cargaron con cinco microlitros de producto. Los resultados se promediaron para obtener un mejor resultado representativo para cada fracción. Tales resultados se encuentran en las tablas proporcionadas más adelante en este documento.

15 Los geles se sometieron a electroforesis durante veinticinco minutos a 100 VDC a un pH de 8,6 y después se tiñeron con un tinte azul de Paragon. Se usó el densitómetro Appraise para barrer los geles secados teñidos a una longitud de onda de 600 nanómetros dos veces para cada ranura de gel (se usaron diez ranuras de gel por gel). Se derivó una representación gráfica promedio de la distribución de cinco fracciones de proteína diferentes basándose en la densidad del colorante unido, además de una presentación numérica de cada fracción. La presentación numérica se basó en un análisis informático de picos y valles de gráficas generadas en localizaciones seleccionadas dentro del patrón de gel como se produce entre el ánodo y el cátodo en cada gel. Los valores de presentación se totalizaron y el porcentaje de colorante se dividió entre la cantidad de colorante total para proporcionar un porcentaje para la evaluación. Obsérvese que la suma total de cada fracción de sangre individual siempre es igual al cien por cien.

20 Como se observa en la Tabla II a continuación, las cinco fracciones de proteína diferentes se identifican como: albúmina, alfa 1, alfa 2, beta y gamma-globulina. Antes del fraccionamiento, una muestra se tomó del conjunto y se sometió a electroforesis para determinar los valores fraccionarios promedio de cada fracción antes de empezar el fraccionamiento. Los resultados representativos para el material reunido base promedio se enumeran a continuación como porcentajes de plasma completo:

Tabla II: Contenido en porcentaje de cada fracción

	Albúmina	Alfa 1	Alfa 2	Beta	Gamma
Plasma base	61,2	7,1	9,7	13,0	8,9

25 El plasma (es decir, el plasma 50) del conjunto se trató con la adición de un volumen de citrato de sodio al cincuenta por ciento a un volumen de plasma para preparar una disolución de citrato de sodio al doce por ciento (etapa 54). Esta mezcla se agitó durante sesenta minutos a de dos a ocho grados centígrados y luego se centrifugó (etapa 56) durante sesenta minutos a de dos a ocho grados centígrados. Se midió la disolución 60 de sobrenadante resultante. La pasta 62 restante se pesó y se puso en disolución mediante la adición de agua desionizada.

Las dos disoluciones (60 y 62 (disuelta)) se sometieron a electroforesis usando los procedimientos citados arriba, cuyos resultados se resumen a continuación en la Tabla III:

Tabla III: Concentraciones en porcentaje resultantes

	Albúmina	Alfa 1	Alfa 2	Beta	Gamma
12% de pasta 62 (disuelta)	67,8	2,7	9,1	20,4	nd*
12% de sobrenadante 60	28,6	1,5	10,7	40,3	16,1
* nd = no detectada					

40 No se encontró gamma-globulina en la pasta 62 (disuelta). Sin embargo, se encontró gamma-globulina en el sobrenadante 60.

A continuación se añadió suficiente disolución de citrato de sodio al cincuenta por ciento al sobrenadante 60 (etapa 64) para obtener una mezcla final que contenía citrato de sodio al veintidós por ciento. Esta disolución también se agitó durante sesenta minutos a de dos a ocho grados centígrados. Después de centrifugar (véase la etapa 66)

durante sesenta minutos a de dos a ocho grados centígrados, la disolución 72 de sobrenadante resultante se midió. La pasta 70 restante se pesó y se puso en disolución (etapa 90) mediante la adición de agua desionizada (cuatro veces el peso de la pasta 70 en mililitros) para formar la disolución 100 rica en IgG. Las muestras del sobrenadante 72 y la disolución 100 rica en IgG se sometieron a electroforesis mediante el procedimiento citado arriba, cuyos resultados se resumen a continuación en la Tabla IV:

Tabla IV: Concentraciones en porcentaje de las disoluciones indicadas

	Albúmina	Alfa 1	Alfa 2	Beta	Gamma
22% de sobrenadante 72	82,4	13,9	3,6	nd*	nd*
22% de disol. 100 (disuelta)	16,7	1,3	10,5	32,5	39,0
* nd = no detectada					

No se encontró gamma-globulina en el sobrenadante 72. Sin embargo, se encontró gamma-globulina en la disolución 100 rica en IgG.

El 22% de fluido de sobrenadante (que contenía principalmente albúmina) no contuvo esencialmente beta y gamma-globulina (es decir, no se detectó ninguna de ellas). La disolución 100 de pasta al veintidós por ciento contuvo la gamma-globulina de interés para el fraccionamiento adicional para producir gamma-globulina intravenosa para inyección. Obsérvese también que en la etapa 90 debe dejarse tiempo para que la pasta se solvate antes de realizarse la electroforesis. En el procedimiento experimental, una fracción de plasma de citrato de sodio entre el doce por ciento y el veintidós por ciento se aisló selectivamente para su uso en este procedimiento de aislamiento.

Para eliminar el citrato de sodio (etapa 102) atrapado en la disolución de pasta al veintidós por ciento se seleccionó una unidad Pellicon para diafiltrar la disolución 100. En promedio, se requirió aproximadamente siete veces el volumen de disolución 100 para diafiltrar el citrato de sodio y llevar la conductividad de la disolución resultante a un intervalo entre 400 y 800 microSiemens/centímetro (uS/cm), antes de realizar cualquier trabajo en columna.

Después de la diafiltración, la disolución 112 de proteínas deseadas se trató electroforéticamente para determinar cualquier cambio o pérdida como resultado de la etapa 102 de diafiltración. Debido a que se eliminó el citrato de sodio, el movimiento de proteínas en el patrón electroforético cambió algo debido a la falta de interferencia con una sal contenida. El patrón resultante fue algo más largo que un patrón de concentración de sales alto. Este patrón alargado permitió separar la IgG más fácilmente de la beta-globulina con un aumento resultante en el porcentaje medido como se observa en la Tabla V, proporcionada a continuación:

Tabla V: Contenido en porcentaje de las fracciones de diafiltrado

	Albúmina	Alfa 1	Alfa 2	Beta	IgG
Disolución 112	16,6	1,5	9,9	26,9	45,2

Como se observa en la Tabla V, aproximadamente el cuarenta y cinco por ciento de disolución 112 fue gamma-globulina y la disolución 112 presentó mejor separación en el patrón de electroforesis. Obsérvese que la fracción beta bajó con mejor separación en el patrón de electroforesis.

En este momento podrían haberse usado diversos procedimientos actualmente empleados para purificar la gamma-globulina en la disolución 112. Por este motivo, la completitud de este experimento podría haber variado de la etapa observada en las Figuras 2-4. En el caso de este experimento, la disolución se trató primero con una disolución de disolvente/detergente de tres horas a veintisiete grados centígrados. Entonces, una disolución de esterilización aumentada realizada según la patente de EE.UU. 6.881.573 titulada PROCEDIMIENTO DE DISOLVENTE/DETERGENTE AUMENTADO PARA INACTIVAR VIRUS ENVUELTOS Y NO ENVUELTOS concedida a Allan L. Louderback presentada el 12 de septiembre de 2003 se añadió a la mezcla y se incubó adicionalmente durante tres horas adicionales a veintisiete grados centígrados. Este tratamiento de inactivación dual de la disolución diafiltrada dializada inactiva tanto virus envueltos como sin envolver.

La disolución tratada estéril se transfirió a una columna de intercambio iónico cargada con la resina Toyopearl CM-650C. La resina adsorbió gamma-globulina y permitió que todas las otras proteínas presentes en la disolución fluyeran fuera en el efluente de la columna. Después de añadir la disolución a la columna y ajustar el flujo de columna para que cayera lentamente a través del extremo del efluente, la disolución de efluente se midió a 280 nanómetros para determinar cuándo todas las proteínas libres y los esterilizantes habían sido transportados por la columna. Después de esto, la columna se lavó con un volumen doble de agua purificada para asegurar que el efluente tenía una densidad óptima medida muy baja a 280 nanómetros.

Entonces se dispensó una disolución al dos por ciento de cloruro sódico sobre la parte superior de la columna y se dejó que percolara por la columna. La gamma-globulina que estaba adsorbida por las partículas de resina se liberó para fluir fuera de la columna en un recipiente receptor.

- 5 El efluente recogido de la columna con agua purificada (marcada como agua purificada) y el efluente de la columna con la disolución al dos por ciento (marcada como el dos por ciento de NaCl) se probaron electroforéticamente para mostrar el resultado del aislamiento seleccionado y la liberación de gamma-globulina de las partículas de resina. Los resultados de esta etapa se resumen en la Tabla VI, véase a continuación:

Tabla VI: Fracciones en porcentaje resultantes

	Albúmina	Alfa 1	Alfa 2	Beta	IgG
Agua purificada	26,0	2,7	15,2	57,0	nd*
Dos por ciento de NaCl	nd*	nd*	nd*	1,9	98,1
* nd = no detectada					

- 10 Obsérvese que más del 98% de la gamma-globulina se aisló en el primer tratamiento de resina. El valor para beta-globulina del 1,9% puede ser el resultado de un punto de aplicación cuando se aplica disolución al gel. La disolución al dos por ciento de cloruro sódico contuvo la gamma-globulina (IgG) y, quizás, con mayores conjuntos de plasma, puede contener algo de globulinas IgA y IgM que deben eliminarse.

- 15 Por tanto, la disolución al dos por ciento de cloruro sódico se diafiltró para eliminar el cloruro sódico para un siguiente tratamiento en columna. La diafiltración se realizó de nuevo pasando la disolución por una unidad Pellicon por la que se eliminó la sal dando un producto final que tenía una conductividad de 400 a 800 microSiemens/centímetro (uS/cm). Obsérvese que probablemente se necesiten aproximadamente seis volúmenes de agua purificada desionizada para diafiltrar la disolución al dos por ciento.

- 20 Como etapa final, una columna se llenó de resina Toyopearl 560-C y se añadió la disolución desalada a la parte superior de la columna y se dejó que percolara lentamente por la columna. En esta columna, la IgG fluyó a través de la resina y todas las otras proteínas se unieron a la resina (por ejemplo, IgA y IgM) para dar un efluente final de la columna (disolución 172) que fue el 100% de IgG en una base acuosa. El efluente probado se observa a continuación en la Tabla VII:

Tabla VII: Contenido en porcentaje de la disolución final

	Albúmina	Alfa 1	Alfa 2	Beta	IgG
Disolución 172	nd*	nd*	nd*	nd*	100
* nd = no detectada					

- 25 Siguiendo la ruta de los diagramas 10-1 y 10-2, se han realizado otros experimentos usando diversas sales en el fraccionamiento de plasma congelado fresco. Las etapas 52, 54 y 64 se repitieron usando las diversas sales para completar el procedimiento de fraccionamiento en las dos etapas como se ha explicado resumidamente arriba. Como se observa en la Tabla VII, más adelante, y de acuerdo con el procedimiento desvelado para el citrato de sodio, las primeras etapas 52 y 54 comprendieron mezclar un volumen fijo de plasma con un primer volumen predeterminado de disolución de sal concentrada, cuando fuera posible. Aunque no fue posible lograr una
- 30 concentración necesaria de sal disolviendo sal en agua, las sales secas se añadieron simplemente para lograr la concentración deseada en peso.

- El primer volumen predeterminado de disolución de sal fue el doce por ciento en peso. Mezcla de reacción seguida a de dos a ocho grados centígrados durante una hora. Después de la mezcla de reacción, la mezcla resultante se centrifugó a de dos a ocho grados centígrados a 4500 rpm durante una hora. Un primer fluido 60 de sobrenadante que se encontraba encima de un precipitante 62 de pasta se vertió cuidadosamente y se recogió. Obsérvese que el
- 35 primer fluido 60 de sobrenadante contenía una disolución al doce por ciento, en peso de la sal usada. Generalmente, el precipitante 62 de pasta resultante se diluyó con un porcentaje en peso de agua desionizada (normalmente cuatro veces el peso del precipitante 62 recogido) y se guardó a de dos a ocho grados durante la noche para el posterior análisis.

- 40 Por la etapa 64, el volumen de sobrenadante 60 se midió y se añadió una cantidad de disolución de sal concentrada para elevar la concentración de sal a un nivel del veintidós por ciento en peso. La composición resultante se mezcló durante una hora a de dos a ocho grados centígrados y luego se refrigeró durante la noche. A la siguiente mañana, la composición se mezcló de nuevo brevemente durante aproximadamente cinco minutos y luego se centrifugó durante una hora a 4500 rpm a de dos a ocho grados centígrados. Cualquier sobrenadante, sobrenadante 72, se

vertió y se guardó para cualquier procesamiento posterior deseado. La pasta 70, la diana de este procedimiento, se pesó y se diluyó (redisuelta por la etapa 90, añadiendo una cantidad de agua desionizada calculada que era aproximadamente cuatro veces el peso de la pasta 70) después de la separación del sobrenadante 72.

5 El procedimiento anteriormente desvelado se repitió para tanto sales orgánicas como inorgánicas en diversas combinaciones. La Tabla VIII, mostrada a continuación, proporciona los resultados del procedimiento como se ha determinado por electroforesis del suero realizada usando el sistema Beckman-Coulter. Los resultados de la electroforesis se barrieron con el escáner de Beckman-Coulter y se presentan como el porcentaje de proteína en cada uno de los cinco niveles, llamados albúmina, alfa-1, alfa-2, beta y IgG. El total para cada barrido por el algoritmo de Beckman se aproxima al 100% cuando se suma.

10 Tabla VIII Resultados de la electroforesis del suero de fraccionamiento de sales - que muestran el % de cada fracción

Expt. n°	Etapas 1 12%	Etapas 2 22%	Albúmina	Alfa 1	Alfa 2	Beta	IgG
1	Sulfato de amonio	Sulfato de amonio	18,1	1,9	25,6	24,6	29,9
2	Citrato de sodio	Citrato de sodio	19,4	1,4	10,1	35,4	33,2
3	Sulfato de amonio	Citrato de sodio	17,0	1,6	9,6	26,4	45,5
4	Citrato de sodio	Sulfato de amonio	17,9	1,6	12,6	24,7	43,2

15 No se encontró IgG en la pasta 62 ni en el sobrenadante 72. Toda la IgG se encuentra en la pasta 70. No debería confundirse debido a que los valores son superiores para IgG para sales orgánicas (citrato de sodio) e inorgánicas (sulfato de amonio) mixtas. Tal es un resultado de una extracción diferencial de otras proteínas del plasma. Algunas proteínas tienen diferentes patrones de precipitación con diferentes sales. El resultado importante es que sustancialmente todas las IgG se encuentran en la pasta 70.

Resultados de un procedimiento realizado mediante el presente procedimiento inventivo usando etanol

20 Sorprendentemente, se ha encontrado que el etanol puede usarse como compuesto de fraccionamiento. Debe observarse que este uso del etanol es marcadamente distinto de los procedimientos contemporáneos e históricos empleando etanol en el fraccionamiento de la sangre.

25 El procedimiento se probó y se registró en cuadernos de laboratorio experimentales fechados el 8 de diciembre de 2005 usando una botella de plasma FFP congelada para proporcionar una comparación con experimentos desvelados arriba. En este experimento, el etanol se usó en concentraciones medidas por porcentaje del mismo modo desvelado para las sales. Por tanto, una disolución al noventa y cinco por ciento de etanol se diluyó para preparar una disolución al cincuenta por ciento de etanol (ciento cinco mililitros de noventa y cinco se añadieron a noventa y cinco mililitros de agua desionizada). Así preparada, la disolución se colocó en un baño de hielo para reducir la temperatura a cinco grados centígrados.

30 Por la etapa 54, sesenta y tres mililitros de la disolución al cincuenta por ciento de etanol se añadieron a doscientos mililitros de plasma FFP (de la restante) que se mantuvo a cinco grados centígrados. La disolución resultante (es decir, el etanol al doce por ciento) se agitó durante una hora en un baño de hielo (a de dos a ocho grados centígrados). Después de agitar, por la etapa 56, la disolución se centrifugó durante una hora usando una centrífuga Beckman J-6 (4500 rpm), mientras que la temperatura se mantuvo a de dos a ocho grados centígrados. El sobrenadante 60 se vertió y la pasta 62 así separada se midió.

35 El volumen de sobrenadante 60 fue 260 mililitros. El peso de la pasta 62 fue 3,823 gramos. La pasta 62 se rehidrató con agua (un volumen de cuatro veces, es decir, 15,3 mililitros y se mezcló bien. La pasta 62 mostró un precipitado similar a un coágulo típico. El volumen diluido final fue 18 mililitros.

40 El sobrenadante 60 se desplazó a un baño de hielo. Se añadió etanol al cincuenta por ciento (noventa y tres mililitros) adicional al sobrenadante 60 para aumentar la concentración de etanol al veintidós por ciento en peso (etapa 64). Esta disolución resultante se agitó durante una hora a de dos a ocho grados centígrados, y luego se guardó durante la noche en un refrigerador (a de dos a ocho grados centígrados).

45 La disolución guardada se agitó durante aproximadamente cinco minutos cuando se sacó del refrigerador, luego se desplazó a una botella de centrífuga y se centrifugó a 4500 rpm durante una hora a de dos a ocho grados centígrados (por la etapa 66). Un sobrenadante 72 se vertió y se recogió una pasta 70. Se observó que la pasta 70 era de color amarillo brillante (lo más comúnmente, la pasta 70 es de un color blanco grisáceo cuando se produce usando sales). Aunque no se supo exactamente, se sospechó que el color amarillo era debido a la bilirrubina y otros cromógenos que habían sido extraídos del plasma por el etanol. Las muestras de archivo se prepararon en cada etapa de fraccionamiento.

ES 2 384 930 T3

Se midió el volumen de sobrenadante (336 mililitros) y se guardó a cinco grados centígrados. La pasta 70 pesó 8,583 gramos. La pasta 70 se rehidrató mediante un volumen de cuatro veces el volumen de agua desionizada (34,3 mililitros), se mezcló bien y se guardó durante la noche a de dos a ocho grados. Es interesante observar la cantidad inesperadamente alta de IgG en la pasta 70 cuando se solvató.

- 5 Los resultados medidos se resumen en la Tablas IX, X y XI, a continuación:

Tabla IX - Electroforesis del suero: mostrando el porcentaje de cada fracción.

	Albúmina	Alfa-1	Alfa-2	Beta	IgG
Pasta 62	39,2	2,2	15,4	33,4	9,7
Sobrenadante 72	73,7	9,1	8,3	8,9	-
Pasta 70	6,7	2,8	17,2	6,7	66,6

Tabla X - Cantidades de volumen del fraccionamiento final.

Muestra	Peso - g	Volumen - ml
Plasma FFP		200
Pasta 62	3,823	18
Sobrenadante 72		336
Pasta 70	8,583	40

Tabla XI - Resultados de proteínas

	ml	g/dl - proteína	g/litro - proteína	g/litro - IgG
Plasma FFP	200	6,05	60,5	6,7 (11% de IgG)
Pasta 62	18	1,09	0,98	0,5
Sobrenadante 72	336	2,73	45,9	-
Pasta 70	40	4,75	9,5	6,3

- 10 No se ejecutó electroforesis en el material base inicial. Sin embargo, obsérvese que hay aproximadamente 6,7 gramos de IgG por litro de plasma. Si la IgG en la pasta 62 se añade a IgG en la pasta 70, el total de 6,8 concuerda bien con los 6,7 gramos por litro anticipados.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el fraccionamiento de material basado en sangre para producir un producto de inmunoglobulina (IgG) intravenosa no desnaturalizada útil que comprende las etapas de:

- 5 (a) después de adquirir una cantidad predeterminada de material basado en sangre procesar y seleccionar una cantidad de plasma como material basado en sangre;
 - (b) preparar dicha cantidad de plasma congelando el plasma, seguido de descongelación controlada calentando gradualmente el plasma a cero a cuatro grados centígrados para formar un plasma descongelado en el que se suspende un crioprecipitado y separar el crioprecipitado para proporcionar un plasma crioempobrecido;
 - 10 (c) efectuar una primera etapa de fraccionamiento en el plasma crioempobrecido añadiendo una primera cantidad predeterminada de citrato de sodio al plasma crioempobrecido para producir una primera concentración de citrato de sodio predeterminada de entre el once y el trece por ciento en peso en disolución para formar un primer producto de sobrenadante separable que tiene una concentración de citrato de sodio entre el once y el trece por ciento en peso en disolución y un primer producto de pasta residual en el que el primer producto de sobrenadante separable está sustancialmente libre de euglobulinas;
 - 15 (d) separar el primer producto de sobrenadante separable del primer producto de pasta residual para completar la primera etapa de fraccionamiento;
 - (e) efectuar una segunda etapa de fraccionamiento en el primer producto de sobrenadante separable añadiendo una segunda cantidad predeterminada de citrato de sodio al primer producto de sobrenadante separable para producir una segunda concentración de citrato de sodio predeterminada de entre el veintiuno y el veintitrés por ciento en peso en disolución para formar un segundo producto de pasta separable y un segundo producto de sobrenadante residual que tiene una concentración de citrato de sodio entre el veintiuno y el veintitrés por ciento en peso en disolución,
 - 20 (f) separar dicho segundo producto de pasta separable de dicho segundo producto de sobrenadante residual para completar la segunda etapa de fraccionamiento;
 - 25 (g) preparar dicho segundo producto de pasta separable para la diafiltración; y
 - (h) diafiltrar dicho segundo producto de pasta separable para formar un menor volumen del tercer producto sustancialmente libre de citrato de sodio.
- 30 2. El procedimiento para el fraccionamiento de material basado en sangre según la reivindicación 1, en el que la etapa (g) comprende formar una dilución líquida de la segunda pasta separable combinando un volumen resultante de dicho segundo producto de pasta separable con un volumen de agua que tiene cuatro veces un peso medible resultante del segundo producto de pasta separable.
- 35 3. El procedimiento para el fraccionamiento de material basado en sangre según la reivindicación 1, en el que la etapa (c) comprende añadir una cantidad de citrato de sodio para producir una primera concentración de citrato de sodio predeterminada en peso en disolución del doce por ciento.
4. El procedimiento para el fraccionamiento de material basado en sangre según la reivindicación 1, en el que la etapa (e) comprende añadir una cantidad de citrato de sodio para producir una segunda concentración de citrato de sodio predeterminada en peso en disolución del veintidós por ciento.
- 40 5. El procedimiento para el fraccionamiento de material basado en sangre según la reivindicación 1 que comprende además una etapa adicional, que sigue a la etapa (e), de fraccionar dicho segundo producto de sobrenadante residual en un grupo de productos que comprende albúmina y alfa-1-antitripsina.
- 45 6. El procedimiento para el fraccionamiento de material basado en sangre según la reivindicación 1, en el que otra etapa, que sigue a la etapa (g), procesa dicho segundo producto de sobrenadante residual para separar albúmina y alfa-1-antitripsina.

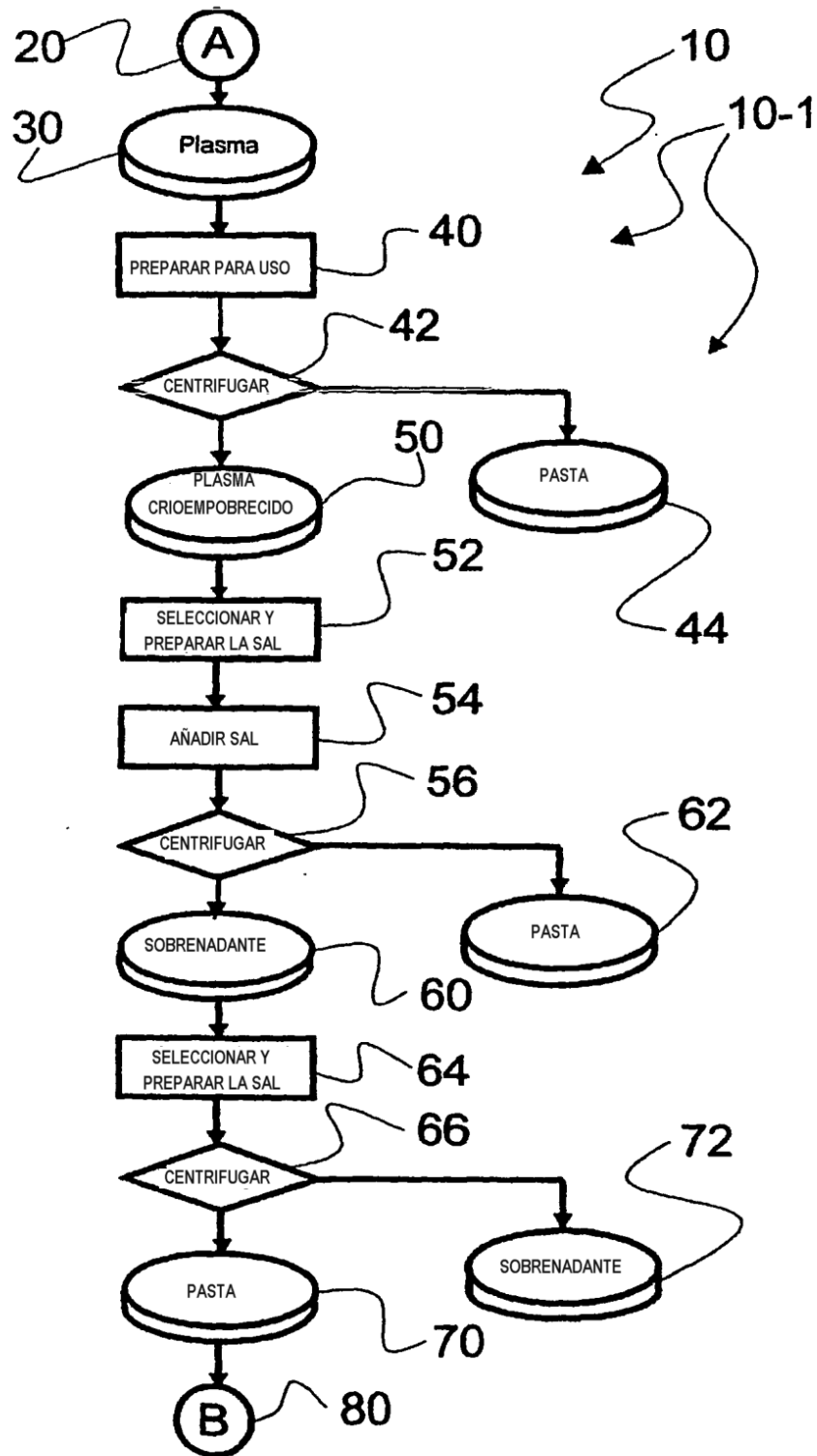


Figura 1

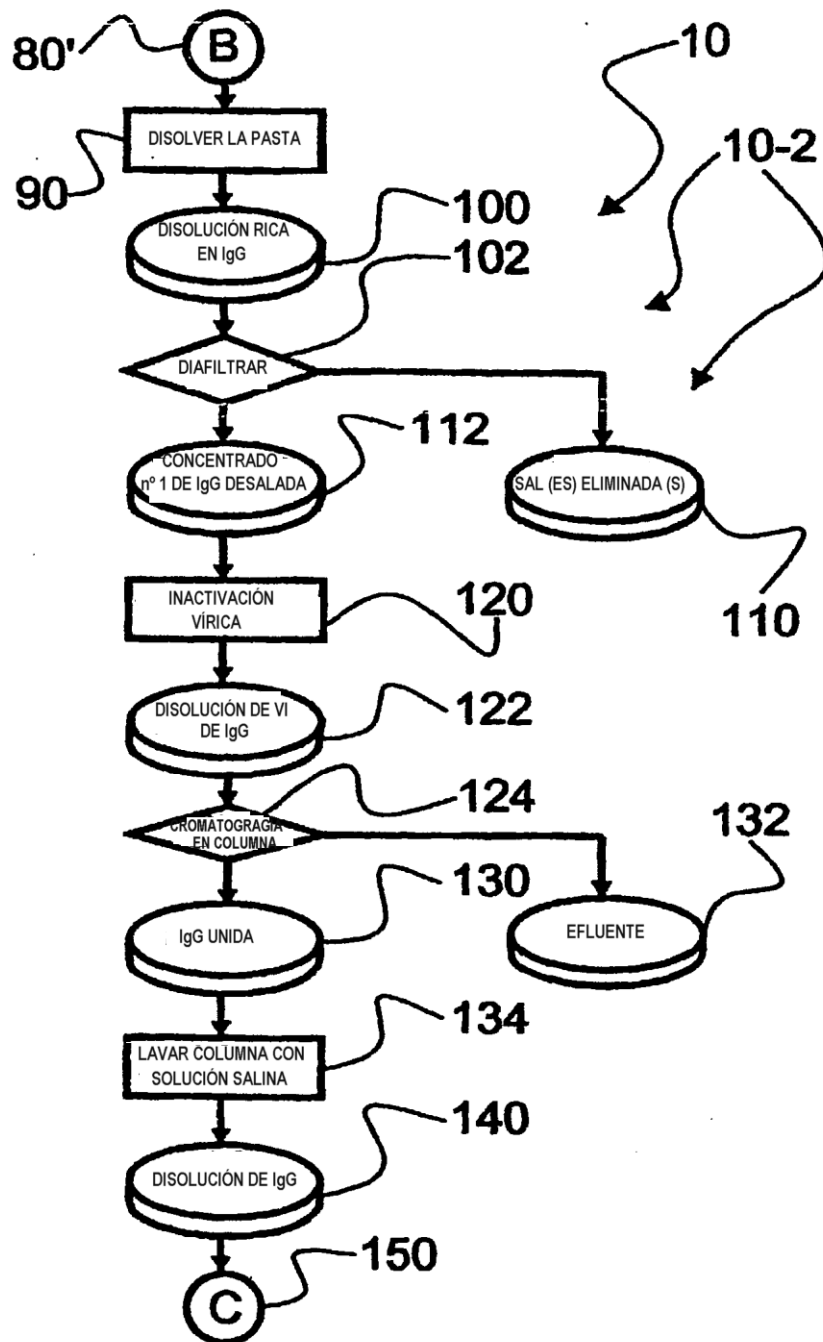


Figura 2

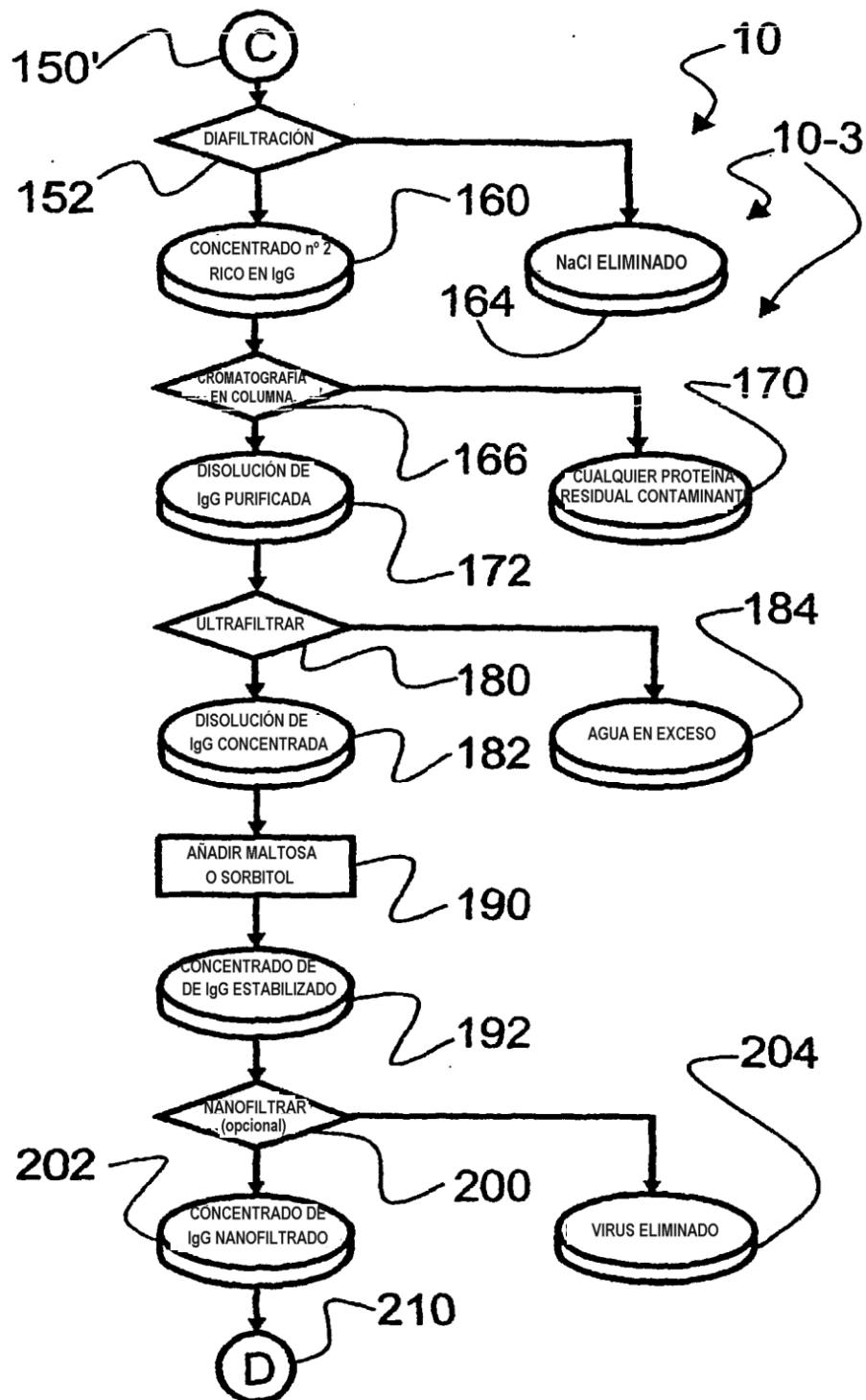


Figura 3

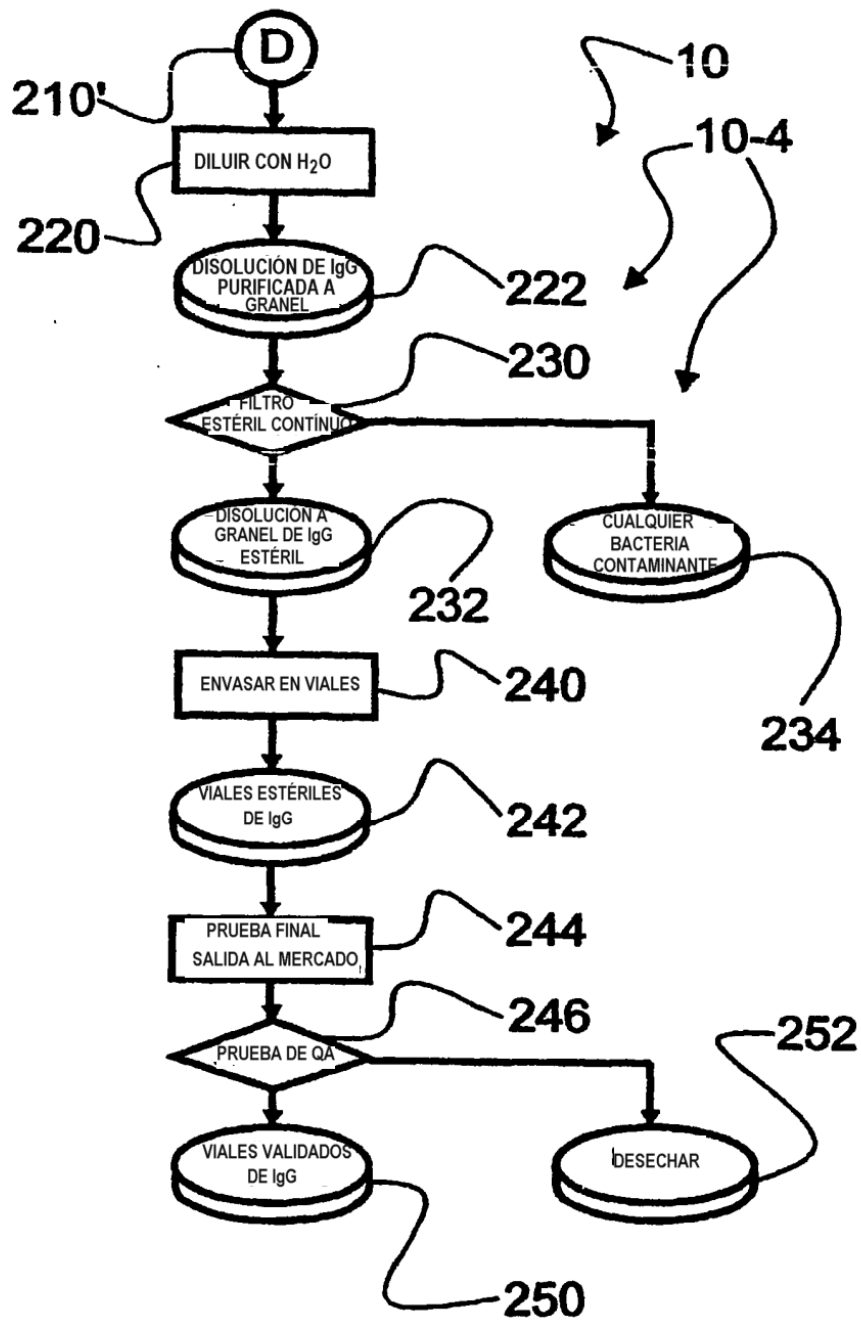


Figura 4