

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 380**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2005** **E 05716804 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013** **EP 1718675**

54 Título: **Procedimiento para proporcionar una preparación de anticuerpos purificada y viralmente segura**

30 Prioridad:

27.02.2004 US 548107 P

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

12.06.2013

73 Titular/es:

**OCTAPHARMA AG (100.0%)
SEIDENSTRASSE 2
8853 LACHEN, CH**

72 Inventor/es:

**BUCHACHER, ANDREA;
IBERER, GÜNTHER y
RÖMISCH, JÜRGEN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 407 380 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para proporcionar una preparación de anticuerpos purificada y viralmente segura

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una preparación de anticuerpos purificada, viralmente segura, a partir de una disolución de partida que comprende anticuerpos y contaminantes. Describe un procedimiento de purificación de las gamma globulinas del plasma humano y de otras fuentes. Las etapas de inactivación y eliminación de virus se incluyen en el procedimiento de fabricación que se describe en el presente documento.

Precipitación y eliminación/inactivación viral resultante

En la década de los años 40, Cohn y col. introdujeron el fraccionamiento del plasma humano con etanol frío. Diversas variaciones de este esquema surgieron para aumentar la pureza y/o el rendimiento de los diferentes productos intermedios. En el fraccionamiento de Cohn se identificaron algunas etapas para contribuir eficazmente a la inactivación y eliminación viral. En el procedimiento de IgG en especial, la separación de la fracción I+III de Cohn es muy eficaz a este respecto. Algunos virus sensibles (principalmente los virus con envoltura) son destruidos por el pH bajo y la presencia de EtOH y una gran parte de los virus con envoltura y sin envoltura se eliminan mediante la separación en el precipitado I+III, que por lo general se desecha.

En la década de los años 60, se mostró que los ácidos grasos de cadena corta (C6-C12) forman complejos insolubles con α - y β -globulinas, mientras que las γ -globulinas no precipitan con tanta facilidad (Chanutin y col., 1960). Steinbruch y col. (1996) describieron un procedimiento de purificación para IgG con caprilato (es decir, octanoato, un ácido graso saturado de 8 átomos de carbono) como agente de precipitación. Se precipitaron componentes del plasma humano diferentes de inmunoglobulinas después de la dilución con un tampón de acetato para alcanzar un pH final de 4,8. Después de la adición de caprilato con agitación vigorosa se obtuvo una disolución enriquecida en IgG. La pureza y el rendimiento dependían de la cantidad de ácido caprílico, del pH, de la molaridad del tampón y del factor de dilución. Steinbruch y col. también afirmaron que es ventajoso añadir la cantidad efectiva de caprilato en dos etapas con la eliminación de los precipitados entre medio. Los virus sin envoltura y con envoltura se eliminan mediante separación en el precipitado de las proteínas no IgG como es el caso de la separación de la fracción I+III.

Cromatografía

Varias patentes describen la purificación de una disolución de IgG en el así llamado modo negativo; la IgG atraviesa sin unirse (sólo en trazas), mientras que la mayoría de las proteínas de la fracción no IgG se unen a los ligandos aniónicos (Bertolini y col. 1998, documento WO-A-98/05686; Lebing 1999, documento US-A-5.886.154; Friesen y col., 1986, documento CA 1.201.063). La combinación de la precipitación con caprilato seguida por cromatografía de intercambio iónico para la purificación de IgG se describió en muchas publicaciones. Una de las primeras fue escrita por Steinbuch y col. (1969). En ella se describe la purificación adicional de IgG después de la precipitación de caprilato con DEAE-celulosa. La reciente publicación por Lebing y col. (2003) describe dos columnas de intercambio aniónico usadas en serie para la eliminación de IgM, IgA, albúmina y otras impurezas. Lebing y col. combinaron ambos efectos mediados por el caprilato, a saber, la reducción esencial de la cantidad de proteínas no IgG por precipitación, utilizando de ese modo la separación de virus, y las propiedades de inactivación de los virus con envoltura del ácido graso en una etapa de incubación independiente. Se destaca la importancia esencial de la así llamada "oscilación de pH" de Lebing y col. (2003), a partir de la reconstitución de una pasta/precipitado que contiene IgG a pH 4,2 y la posterior adición de caprilato tras ajustar el pH a 5,2 para el procedimiento de enriquecimiento de IgG, por lo tanto es necesaria para reducir de forma eficaz la cantidad de las proteínas no IgG. La cantidad de algunas otras impurezas, tales como IgA e IgM, así como el caprilato se redujo posteriormente por medio de las etapas de cromatografía de intercambio iónico mencionadas.

Sorprendentemente, los inventores encontraron que tal cambio de pH como el que se describe anteriormente y que está descrito por Lebing y col. no es necesario para lograr un efecto de purificación significativa tras la adición de caprilato y la eliminación del precipitado resultante. En su lugar, si se mantiene constante el pH a un pH de 4,6 a 4,95 durante todo el procedimiento de reconstitución de la pasta, la incubación con caprilato y la eliminación del precipitado, se consigue un enriquecimiento de IgG eficaz. También se reduce la cantidad de impurezas, especialmente albúmina, de manera más eficiente, si se mantiene el pH constante en el intervalo de 4,8 a 4,95. Al mismo tiempo, se eliminan los virus. Posteriormente se separan las impurezas residuales y el caprilato por medio de las etapas de intercambio iónico.

Inactivación clásica de virus

Los tratamientos con disolvente y detergente y pH 4 son procedimientos muy conocidos y ampliamente utilizados para las inmunoglobulinas. El tratamiento con disolvente y detergente (SD, por su sigla en inglés) se introduce normalmente en estos procedimientos debido a su superioridad en términos de inactivación de los virus con envoltura (Biesert L. Clinical and Experimental Rheumatology 1996; 14: 47). Tanto los virus con envoltura como los sin envoltura se ven afectados por la exposición a pH bajo, aunque los virus con envoltura se ven más afectados que

los que no tienen envoltura (Biesert. Clinical and Experimental Rheumatology 1996, 14: 47, Bos y col. Biologicals 1998; 26: 267, In Seop y col. J Microbiol Biotechnol 2001; 11: 619).

En el documento EP-A-0 525 502 se describen la combinación de tratamiento con disolvente y detergente y la incubación a pH 4 como etapas de inactivación de virus.

5 Filtración de virus

Las disoluciones de IgG se filtran a través de membranas de tamaño de poro muy pequeño (normalmente de 15 a 50 nm) en condiciones que retienen los virus por un mecanismo basado en la exclusión por tamaños (Burnouf and Radosevich. Haemophilia 2003; 9: 24) para aumentar la seguridad viral. Para la filtración de las inmunoglobulinas también se utilizan los filtros de profundidad diseñados para retener los virus por adsorción de intercambio iónico.

10 **Sumario de la invención**

La invención describe un procedimiento de purificación de IgG con un mayor rendimiento y un menor tiempo de procedimiento en comparación con el procedimiento de fraccionamiento clásico de Cohn-Onclly. Se reconstituye la IgG en tampón a un intervalo de pH ácido de 4,60 a 4,95, de preferencia 4,9. Las proteínas no IgG se separan por dos etapas de incubación con caprilato en un intervalo de concentraciones de caprilato de 10 a 30 mM, de preferencia 20 mM.

Para la inactivación eficaz de los virus con envoltura, se puede añadir una incubación conocida como tratamiento con disolvente y detergente con TNBP y Triton X-100, Tween 80, etc., para aumentar la capacidad de inactivación de virus de todo el procedimiento. Se puede añadir una eliminación de virus por filtración, es decir por los así llamados filtros de nanofiltración o filtros cargados de profundidad, a los procedimientos de eliminación de virus. Además, el tratamiento UVC se puede realizar también en combinación con los tratamientos mencionados anteriormente. Tales tratamientos se describen por ejemplo en los documentos EP-A-0 840 624 o EP-A-0 422 007.

Además, el caprilato/ácido caprílico se puede combinar con o sustituir por heptanoato/ácido heptanoico para llevar a cabo la precipitación anteriormente mencionada y las etapas del procedimiento de incubación.

25 El producto obtenible por el procedimiento de la invención está viralmente inactivado. Los priones también son inactivados/eliminados debido al tratamiento con caprilato.

Las figuras 1 y 2 representan un diagrama de flujo de formas de realización particulares del procedimiento de la invención.

Descripción detallada de la invención

30 La invención se refiere a un procedimiento para preparar una preparación de anticuerpos purificada, viralmente inactivada y viralmente segura a partir de una disolución de partida que comprende anticuerpos y contaminantes, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) ajustar el pH de la disolución de partida a un valor entre 4,6 y 4,95, en particular a un valor entre 4,8 y 4,95, para producir una disolución intermedia;

35 (b) añadir iones caprilato y/o heptanoato a la disolución intermedia y mantener el pH entre 4,8 y 4,95, con lo que se forma un precipitado y los anticuerpos están esencialmente presentes en el sobrenadante;

(c) incubar la disolución sobrenadante tras una segunda adición de iones caprilato y/o heptanoato en las mismas condiciones que en la etapa b), realizar la filtración de la disolución resultante y opcionalmente concentrar y diafiltrar la disolución filtrada antes de ajustar el pH;

40 (d) aplicar la disolución filtrada en al menos una resina de intercambio aniónico a un pH de entre 5,0 y 5,2 y, opcionalmente, con dos resinas de intercambio aniónico diferentes en condiciones que permitan la unión de los contaminantes a la resina y que al mismo tiempo no permitan una unión significativa de los anticuerpos a la resina, en el que se produce una preparación de anticuerpos purificada, viralmente inactivada y viralmente segura.

45 Si se realizan dos cromatografías de intercambio de aniones, la segunda cromatografía se puede realizar en un intervalo de pH de 6,7 a 6,9. Opcionalmente se pueden repetir las etapas (b) y (c) al menos una vez. El tratamiento con caprilato a un pH de 4,9 da lugar a una eliminación significativa de proteínas no deseadas. Típicamente, la disolución de partida comprende anticuerpos derivados de plasma.

50 Puede ser ventajoso poner en contacto en la etapa (d) la disolución inactivada con dos resinas de intercambio aniónico diferentes en condiciones tales que los contaminantes se unan selectivamente a las resinas mientras que los anticuerpos no se unan significativamente a las resinas.

De preferencia, los anticuerpos son del tipo inmunoglobulina G.

Entre las dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) se puede cambiar el pH, en particular, hasta $6,8 \pm 0,1$. El flujo a través de la AEX puede concentrarse hasta 60 a 90 mg/ml y someterse a diafiltración contra, por ejemplo tampón de fosfato. En otra forma de realización del procedimiento de la invención, el flujo a través de la primera AEX se trata con disolvente y detergente, de preferencia con TnBP y Triton X-100, de preferencia en concentraciones de Triton X-100 al 1 % y al TnBP 0,3 % durante 4,5 a 8 horas para inactivar los virus con cubierta lipídica. El procedimiento se conoce como tratamiento con disolvente y detergente, y se da a conocer en el documento EP-A-0 131 740 (se incorpora por referencia). Según la invención, los detergentes de la mezcla de incubación se eliminan, en particular, mediante extracción en fase sólida y líquida. Después de la extracción en fase sólida se ajusta el pH de la disolución a un valor entre 6,7 y 6,9. La combinación del tratamiento con disolvente y detergente y la inactivación de los virus con caprilato da lugar a un producto más seguro.

La disolución ajustada de esa manera se puede aplicar a la segunda columna de AEX donde se puede ajustar el pH del flujo a través de la AEX por ejemplo a un valor entre 3,5 y 4,5, en particular a $4,0 \pm 0,1$. Según la invención, la disolución de IgG con el pH ajustado se pone en contacto con un filtro de virus. Esta etapa opcional en combinación con el tratamiento con caprilato da lugar a un producto viralmente más seguro.

La disolución de IgG también se puede incubar a $37 \text{ °C} \pm 1$ durante al menos 24 horas. Con el fin de mejorar la seguridad del producto de anticuerpos en lo que respecta a virus, se puede combinar el tratamiento con UV-C con el tratamiento con caprilato de la fracción que contiene los anticuerpos. Los procedimientos de inactivación por sí solos o en combinación, tales como el tratamiento con TnBP, el tratamiento con UV-C, la filtración de virus o el calentamiento se pueden combinar con el procedimiento de la invención.

El procedimiento según la invención se puede combinar con procedimientos para eliminar o inactivar priones, por ejemplo, procedimientos de filtración o adsorción o procedimientos cromatográficos como se dan a conocer en la técnica anterior, por ejemplo, en el documento EP-A-0 954 528, Trejo, S. R. y col., Vox Sanguinis, (2003) 84,176-187. La disolución de IgG obtenida según la invención se concentra como respuesta al uso terapéutico previsto, típicamente hasta concentraciones del 5 o del 10 % y la osmolaridad del concentrado se ajusta hasta 200 a 400 mOsmol/kg por medio de un aditivo adecuado. Sin embargo, cualquier otro valor es posible con la condición de que sea farmacéuticamente aceptable. Tales aditivos son muy conocidos por el experto e incluyen, pero sin limitación, azúcares, alcoholes de azúcar y aminoácidos. Se puede ajustar el pH de la disolución de IgG a valores entre 3,5 y 6,0, en particular entre 4,0 y 5,5. Por último, la disolución de IgG se filtra de manera estéril y se carga en frascos de vidrio o recipientes de plástico. Como alternativa, el flujo a través de la primera o segunda etapa de AEX se aplica a nanofiltros para obtener un producto aún más seguro.

El procedimiento de la invención se describe con más detalle, de preferencia realizado como se indica:

Como material de partida se usó fracción I + II + III o fracción II + III de plasma humano. Estas fracciones fueron producidas como está descrito por Cohn y col. (1946). El ajuste del pH durante el procedimiento se realizó con ácido acético 1 M, NaOH 0,1 M o HCl 0,3 M. Se añadió caprilato como una disolución madre de caprilato de sodio 1 M. Esta disolución madre se preparó disolviendo 166 g de caprilato de sodio en 1 litro de agua para inyectables (API) y agitando hasta la disolución total del caprilato de sodio.

A modo de ejemplo, para el tratamiento con disolvente y detergente se utilizaron TnBP y Triton X-100. Para la eliminación de los reactivos SD se utilizó aceite vegetal, tal como aceite de soja o aceite de ricino.

Todos los reactivos eran de grado USP o superior.

Se utilizó cromatografía cuantitativa de exclusión por tamaño y ELISA para determinar la concentración de IgG. La HPLC analítica se realizó con un sistema de HPLC Agilent con una columna TosohHaas G3000SW.

En la figura 1 se muestra un dibujo esquemático del procedimiento. El procedimiento comenzó con la disolución del precipitado de IgG, denominado pasta, en agua purificada. Por lo general, cuanto mayor es el volumen de agua necesario para reconstituir la pasta, mayor es el rendimiento de IgG. El pH de la disolución se ajustó a un valor entre 4,60 y 4,95, de preferencia 4,90 con ácido acético 1 M. La disolución se agitó durante varias horas para obtener la mayor cantidad posible de IgG en disolución. A continuación, se añadió caprilato como una disolución madre 1 M hasta concentraciones de entre 10 y 30 mM, de preferencia caprilato 20 mM. Durante la adición del caprilato se mantuvo el pH constante entre 4,80 y 4,95, de preferencia 4,90. Durante la incubación de la disolución de IgG con caprilato precipitaron las proteínas no IgG y los lípidos. El precipitado formado se eliminó por filtración de la disolución de IgG. Después de la primera etapa de precipitación en la disolución de IgG permanecen algunas impurezas. Por lo tanto, es necesario un segundo tratamiento con caprilato. De manera similar a la primera etapa, se añadió el caprilato como disolución madre 1 M hasta una concentración de caprilato en disolución aproximadamente 20 mM, a un pH constante entre 4,80 y 4,95, de preferencia 4,9. Después de la incubación se eliminó el precipitado por filtración o por centrifugación. Para lograr un mejor rendimiento se utilizó un coadyuvante de filtración durante la filtración. Se ajustó el pH de la disolución filtrada a un valor entre 5,0 y 5,2, de preferencia 5,1 y se aplicó a una columna de intercambio de aniones. Como columna de intercambio de aniones, se eligieron preferentemente intercambiadores de aniones fuertes tales como Q-Sepharose FF, Q-Sepharose-HP, Q-Sepharose-XL, Source Q 15

o 30 (Amersham Bioscience), Q-thruput, Q-thruput plus (Sterogene), Macro Prep Q y Macro Prep High Q (Bio-Rad), Q Hyper D (BioSeptra) y Poros HQ (PerSeptive Biosystems).

La IgG fluyó a través de la columna bajo las condiciones elegidas, mientras que algunos aditivos e impurezas tales como caprilato e IgA se unieron a la resina. La disolución de proteínas se cargó en la columna en una proporción de 40 a 120 mg, en particular de 40 a 90 mg de proteína por ml de resina. El flujo obtenido a través se concentró hasta una concentración de proteína de 60 a 90 mg/ml, de preferencia de 70 mg/ml y se sometió a diafiltración contra 5 volúmenes de tampón de fosfato con una concentración de fosfato de sodio de 5 a 20 mM, de preferencia 10 mM. Como una etapa opcional de inactivación de virus se puede elegir el tratamiento con disolvente y detergente después de la diafiltración. La disolución diafiltrada se sometió a continuación a inactivación viral mediante el tratamiento con disolvente y detergente descrito por Horowitz, por ejemplo, en el documento EP-A-0 131 740. Como reactivos disolvente y detergente se utilizaron TnBP y Tritón X-100. Después de agitar, la solución se incubó hasta 8 horas a una temperatura de entre 4 y 10 °C. A continuación, se añadió un aceite vegetal tal como aceite de soja o aceite de ricino, de preferencia aceite de ricino, a la disolución hasta una concentración del 3 al 5 % (p/p). Después de la separación de la fase oleosa de la fase acuosa, se filtró la fase acuosa. Por consiguiente, se utilizó un filtro de profundidad adecuada. Ejemplos de estos filtros son Polysep II (Millipore), Sartofine PP y Sartobran P (Sartorius). La posterior extracción en fase sólida se llevó a cabo de un modo preferido mediante el uso de un medio de soporte hidrófobo que también se utiliza en la cromatografía de fase inversa con una matriz de gel fabricada a base de sílice, copolímeros de estireno y divinilbenceno (SDVB), copolímeros de metacrilato de glicidilo y dimetacrilato de etileno o poliaramático. Ejemplos de estos medios son μ bondapak (Waters), Amberchrom CG-161 M y S, Amberchrom CG-070 (Tosoh Biosep), PLRP-S (Polymer Laboratories), RPC-1 y Toyopearl Hexyl 650C (Tosoh Biosep), Source 15 RPC (Amersham Biosciences), LiChroprep Si60 (Merck), Chromabond Sorbent HR-P y EASY (Machery-Nagel), ProntoSORB SPE (Bischoff Chrom.). La disolución de proteínas se cargó en la columna en una proporción de 0,5 a 1,5 mg/ml de resina seca. El flujo a través de la extracción en fase sólida (o de la etapa de cromatografía, respectivamente) se trató con UVC y a continuación se ajustó a un pH entre 6,7 y 6,9, de preferencia 6,8 por adición de NaOH 0,1 M a una temperatura entre 4 y 10 °C. A continuación, se aplicó la solución de IgG a una segunda columna de intercambio de aniones. La IgG no retenida fluyó a través de la columna, mientras que las impurezas y los polímeros se unieron a la columna. Como columna de intercambio de aniones, se eligieron preferentemente intercambiadores de aniones fuertes tales como Q-Sepharose-FF, Q-Sepharose-HP, Q-Sepharose-XL, Source Q 15 o 30 (Amersham Bioscience), Q-thruput, Q-thruput plus (Sterogene), Macro Prep Q y Macro Prep High Q (Bio-Rad), Q Hyper D (BioSeptra) y Poros HQ (PerSeptive Biosystems). La columna se equilibró con un tampón de fosfato de sodio 10 mM. Después de la aplicación de la disolución de IgG se lavó la columna con tampón de equilibrado para obtener toda la IgG no unida de la columna. La disolución de proteínas se cargó en la columna en una proporción de 120 a 300 mg de proteína/ml de resina. Se ajustó el pH de la disolución de IgG recogida entre 3,9 y 4,1, de preferencia 4,0 con HCl 0,3 M a una temperatura entre 4 y 10 °C. A continuación, se filtró la disolución de manera estéril y se almacenó a 37 °C durante al menos 24 horas. Con posterioridad al tratamiento a pH bajo, se ajustó el pH de la disolución a 4,7 con NaOH 0,1 M a una temperatura entre 4 y 10 °C. Como otra etapa de reducción de virus adecuada se pueden utilizar filtros de virus. Para la filtración de virus, la disolución de IgG se filtró a través de un filtro de 0,1 μ m seguido de filtros de virus con un tamaño de poro de entre 200 y 15 nm. Ejemplos de estos filtros son DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 75, 35, 20, 15 N (Asahi Kasei Pharma). También se puede utilizar un filtro de profundidad con carga como Zeta Plus VR (Cuno). Esta etapa de filtración también se puede aplicar después de la incubación a pH 4. De preferencia, esta etapa se lleva a cabo en el procedimiento antes del tratamiento a pH bajo. La disolución de IgG altamente purificada se sometió a diafiltración y se concentró hasta los valores finales de la formulación. Como concentraciones finales para una formulación líquida se eligieron concentraciones de proteína del 5 o del 10 % (p/v). Después de la concentración se ajustó la osmolaridad para que sea compatible para la inyección intravenosa mediante un aditivo adecuado. Se pueden utilizar azúcares, alcoholes de azúcar y aminoácidos. Se comprobó nuevamente el pH y se ajustó a un valor entre 4,5 y 5,0, de preferencia 4,7. Posteriormente, se llevó a cabo otra filtración estéril y se cargó la disolución en frascos de infusión.

Los siguientes ejemplos explican el procedimiento de la invención con más detalle:

50 **Ejemplo 1:**

Se disolvió la fracción de Cohn I + II + III o II + III en 12 volúmenes de agua, se ajustó el pH a 4,9 con ácido acético 1 M y se agitó la disolución durante hasta 5 horas hasta la disolución de la mayor parte de la IgG a una temperatura de 2 a 8 °C. A continuación, se añadió el caprilato como disolución madre de caprilato de sodio 1 M a la disolución de IgG hasta una concentración de caprilato 20 mM, manteniendo el pH constante en 4,9 mediante la adición de ácido acético 1 M. Esta disolución se agitó durante una hora. Los lípidos y las impurezas precipitaron bajo estas condiciones y se eliminaron por filtración. A continuación se añadió a la disolución nuevamente caprilato hasta una concentración de 20 mM en disolución tras mantener el pH constante en 4,9. Una vez más se generó un precipitado y se eliminó por filtración. Después de la filtración se obtuvo una disolución transparente. Se ajustó el pH de la disolución a 5,1 con NaOH 0,1 M a una temperatura de 7 ± 3 °C y se aplicó a la columna Source Q 30. La disolución de IgG fluyó a través de la columna mientras que las impurezas y el caprilato se unieron a la columna. La disolución de IgG recogida se concentró hasta una concentración de proteínas de 70 mg/ml y se sometió a diafiltración contra 5 volúmenes de un tampón de fosfato de pH 5,1. Posteriormente, se añadieron TnBP al 0,3 % (p/p) y Triton X-100 al 1 % (p/p) a la disolución, seguido de agitación vigorosa. Después de al menos 4,5 horas de agitación a 7 ± 3 °C, se

añadió aceite de ricino al 5 % (p/p). La extracción con aceite se llevó a cabo a temperatura ambiente. Se separaron las fases oleosa y acuosa y la fase acuosa se filtró con un filtro Opticap Polysep de Millipore. La disolución filtrada se aplicó a una columna rellena con una matriz de fase inversa denominada μ Bondapak (Waters). A continuación, se ajustó el pH de la disolución a 6,8 con NaOH 0,1 M a una temperatura de 7 ± 3 °C y se aplicó a un intercambiador de aniones fuertes, a saber, Q-Sepharose-XL. La IgG fluyó a través de la columna mientras que las impurezas se unieron a la columna. El pH de la disolución de IgG recogida se ajustó a 4,7 con NaOH 0,1 M a una temperatura de 7 ± 3 °C. Una vez más, se llevó a cabo una ultrafiltración para ajustar la concentración de proteínas a la concentración final de 50 o 100 mg/ml, seguida de la adición de maltosa a un intervalo de concentraciones del 2 al 10 % (en peso), de preferencia del 8 % o glicina en un intervalo de concentraciones de 0,1 a 0,5 M, en particular 0,1 a 0,3 M, de preferencia 0,3 M y en particular 0,2 M. Posteriormente a la siguiente filtración estéril, se cargó la disolución en frascos de infusión esterilizados y siliconados con diferentes volúmenes (50, 100, 200 ml). Los frascos se sellaron por medio de tapones.

Ejemplo 2:

Este ejemplo en particular, se diferencia del ejemplo 1 por la implementación de una etapa de incubación a pH 4. Se disolvió la fracción de Cohn I + II + III o II + III en 12 volúmenes de agua, se ajustó el pH a 4,9 con ácido acético 1 M y la disolución se agitó durante hasta 5 horas hasta la disolución de la mayor parte de la IgG a una temperatura de 2 a 8 °C. A continuación, se añadió caprilato como una disolución madre de caprilato de sodio 1 M a la disolución de IgG hasta una concentración de caprilato 20 mM en disolución y se mantuvo el pH constante en 4,9 mediante la adición de ácido acético 1 M. Esta disolución se agitó durante una hora. Los lípidos y las impurezas precipitaron bajo estas condiciones y se eliminaron por filtración. A continuación, se añadió nuevamente caprilato a la disolución hasta una concentración de 20 mM tras mantener el pH constante en 4,9. Una vez más el precipitado formado se eliminó por filtración. Después de la filtración se obtuvo una disolución transparente. La disolución de IgG recogida se concentró hasta una concentración de proteínas de 70 mg/ml y se sometió a diafiltración contra 5 volúmenes de un tampón de fosfato de pH 5,1. Se ajustó el pH de la disolución a 5,1 con NaOH 0,1 M a una temperatura de 7 ± 3 °C y se aplicó a la columna de intercambio de aniones fuertes Q-Sepharose-XL. La IgG fluyó a través de la columna mientras que las impurezas y el caprilato se unieron a la columna. Posteriormente, se añadieron TnBP al 0,3 % (p/p) y Triton X-100 al 1 % (p/p) a la disolución, seguido de agitación vigorosa. Después de al menos 4,5 horas de agitación a una temperatura de 4 a 10 °C, se añadió aceite de ricino al 5 % (p/p). La extracción con aceite se llevó a cabo a temperatura ambiente. Se separaron las fases oleosa y acuosa y la fase acuosa se filtró con un filtro Opticap Polysep de Millipore. La disolución filtrada se aplicó a una columna rellena con Amberchrom CG-161M. A continuación, se ajustó el pH de la disolución a 6,8 con NaOH 0,1 M a una temperatura de 7 ± 3 °C y se aplicó al intercambiador de aniones fuertes Q-Hyper D. La IgG fluyó a través de la columna mientras que las impurezas se unieron a la columna. El pH de la disolución de IgG recogida se ajustó a 4,0 con HCl 0,3 M a una temperatura de 7 ± 3 °C. La disolución se filtró de manera estéril y se almacenó a 37 ± 3 °C durante al menos 24 horas. A continuación, se ajustó el pH de la disolución a 4,7 con NaOH 0,1 M a una temperatura de 7 ± 3 °C. Una vez más, se llevó a cabo una ultrafiltración para ajustar la concentración de proteínas a la concentración final de 50 o 100 mg/ml obtenida tras la formulación con maltosa o glicina. Posteriormente a la siguiente filtración estéril, se cargó la disolución en frascos de infusión esterilizados y siliconados con diferentes volúmenes (50, 100, 200 ml). Los frascos se sellaron por medio de tapones.

Ejemplo 3:

Este ejemplo en particular, se diferencia de las anteriores muestras por la concentración de la disolución de IgG hasta 70 mg/ml de concentración de proteína antes de la primera etapa de AEX y por implementación de una etapa de nanofiltración.

Se disolvió la fracción de Cohn I + II + III o II + III en 12 volúmenes de agua, se ajustó el pH a 4,9 con ácido acético 1 M y la disolución se agitó durante hasta 5 horas hasta la disolución de la mayor parte de la IgG a una temperatura de 2 a 8 °C. A continuación, se añadió caprilato como una disolución madre de caprilato de sodio 1 M a la disolución hasta una concentración de caprilato 20 mM en disolución y se mantuvo el pH constante en 4,9 mediante la adición de ácido acético 1 M. Esta disolución se agitó durante una hora. Los lípidos y las impurezas precipitaron bajo estas condiciones y se eliminaron por filtración. A continuación, se añadió nuevamente caprilato a la disolución hasta una concentración de 20 mM tras mantener el pH constante en 4,9. Una vez más se generó un precipitado y se eliminó por filtración. Después de la filtración se obtuvo una disolución transparente. La disolución de IgG recogida se concentró hasta una concentración de proteínas de 70 mg/ml y se sometió a diafiltración contra 5 volúmenes de un tampón de fosfato de pH 5,1. Se ajustó el pH de la disolución a 5,1 con NaOH 0,1 M a una temperatura de 7 ± 3 °C y se aplicó a un intercambiador de aniones fuertes. La IgG fluyó a través de la columna mientras que las impurezas y el caprilato se unieron a la columna. A continuación, se ajustó el pH de la disolución a 6,8 con NaOH 0,1 M a una temperatura de 7 ± 3 °C y se aplicó a un segundo intercambiador de aniones fuertes. La IgG pasó a través de la columna mientras que las impurezas se unieron a la columna. Se ajustó el pH de la disolución de IgG recogida a 4,0 con HCl 0,3 M a una temperatura de 7 ± 3 °C. La disolución se filtró a través de un filtro de 0,1 μ m, después del uso de una cascada de filtros PALL, a saber PALL DVD, DV 50 y DV 20 con tamaños de poro de hasta 20 nm para la nanofiltración. La disolución nanofiltrada se almacenó a 37 ± 3 °C durante al menos 24 horas. A continuación, se ajustó el pH de la disolución a 4,7 con NaOH 0,1 M a una temperatura de 7 ± 3 °C. Una vez más, se llevó a cabo una

ultrafiltración para ajustar la concentración de proteínas a la concentración final de 50 o 100 mg/ml obtenida tras la formulación con maltosa o glicina por medio de la adición de maltosa o glicina. Posteriormente a la siguiente filtración estéril, se cargó la disolución en frascos de infusión esterilizados y siliconados con diferentes volúmenes (50, 100, 200 ml). Los frascos se sellaron por medio de tapones.

5 **Ejemplos comparativos**

Procedimiento de la invención

Se reconstituyeron aproximadamente 310 g de fracción I + II + III (incluyendo adyuvantes de filtración) en 12 volúmenes de API calculados a partir del peso teórico de la fracción I + II + III, sin adyuvantes de filtración. La disolución se agitó durante 1 hora a 5 °C. A continuación, se ajustó el pH a 4,9 ± 0,1 (ca. 950 g). Se continuó con la reconstitución durante 2 horas a 5 °C. A continuación, se recogió la muestra "Fracción I + II + III reconstituida". Se añadió una disolución de caprilato 1 molar hasta alcanzar una concentración de 20 mM. El pH se mantuvo constante en 4,9. La disolución se incubó durante 1 hora a 5 °C. La disolución se filtró a través de un filtro de profundidad y una hoja de papel a 5 °C (ca. 1050 g). Posteriormente se lavó el filtro con una disolución de cloruro de sodio 10 mM. Se calentó el filtrado a 25 °C, se añadió la disolución de caprilato 1 molar hasta alcanzar una concentración de 10 mM adicional. La disolución se incubó durante 1 hora a 25 °C. Se centrifugó la disolución y se filtró el sobrenadante a través de un filtro (1110 g) que tenía un tamaño de poro de 1 µm y 0,5 µm. Se recogió la muestra "después del caprilato".

Según el documento EP 0 893 450

Se reconstituyeron aproximadamente 310 g de fracción I + II + III (incluyendo adyuvantes de filtración) en 7 volúmenes de API calculados a partir del peso teórico de la fracción I + II + III, sin adyuvantes de filtración. La disolución se agitó durante 1 hora a 5 °C. Se ajustó el pH a 4,1 ± 0,1. Se continuó con la reconstitución durante 2 horas a 5 °C. A continuación, se recogió la muestra "Fracción I + II + III reconstituida". Se añadió una disolución de caprilato 1 molar hasta alcanzar una concentración de 20 mM. El pH cambió a 4,9 tras la adición del caprilato y se ajustó a 5,1. La disolución se incubó durante 1 hora a 5 °C. La disolución se filtró a través de un filtro de profundidad y una hoja de papel a 5 °C. Posteriormente se lavó el filtro con una disolución de cloruro de sodio 10 mM (ca. 1050 g). Se calentó el filtrado a 25 °C, se añadió la disolución de caprilato 1 molar hasta alcanzar una concentración de 10 mM adicional. La disolución se incubó durante 1 hora a 25 °C. Se centrifugó la disolución y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 µm (ca. 1110 g). Se recogió la muestra "después del caprilato".

Eliminación de albúmina e IgA

		Invención pH 4,9	EP 0 893 450 5,1
Experimento	Muestras	Albúmina	Albúmina
		[IgG µg/mg]	[IgG µg/mg]
1	Fr. I + II + III rec.	27,1	32,9
	después del caprilato	0,2	10,2
2	Fr. I + II + III rec.	44,2	32,6
	después del caprilato	0,2	2,2
3	Fr. I + II + III rec.	30,2	31,2
	después del caprilato	0,8	9,9
4	Fr. I + II + III rec.	22,7	33,1
	después del caprilato	0,9	10,7
	Fr. I + II + III rec. promedio	31,1	32,5
	Fr. I + II + III rec. desv. est.	9,3	0,9
	Fr. I + II + III rec. promedio	0,5	8,3
	Fr. I + II + III rec. desv. est.	0,4	4,0
Experimento	Muestras	IgA	IgA
		[IgG µg/mg]	[IgG µg/mg]
1	Fr. I + II + III rec.	86	106

ES 2 407 380 T3

	después del caprilato	40,9	49,3
2	Fr. I + II + III rec.	74,3	120,7
	después del caprilato	23,7	60,5

(continuación)

Experimento	Muestras	IgA	IgA
3	Fr. I + II + III rec.	88,5	114
	después del caprilato	30,8	56,9
4	Fr. I + II + III rec.	115,5	113,6
	después del caprilato	34,4	51,3
	Fr. I + II + III rec. promedio	91,1	113,6
	Fr. I + II + III rec. desv. est.	17,4	6,0
	Fr. I + II + III rec. promedio	32,5	54,5
	Fr. I + II + III rec. desv. est.	7,2	5,1

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una preparación de anticuerpos purificada, viralmente inactivada y viralmente segura, a partir de una disolución de partida que comprende anticuerpos y contaminantes, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 (a) ajustar el pH de la disolución de partida a un valor entre 4,6 y 4,95, en particular a un valor entre 4,8 y 4,95, para producir una disolución intermedia;
- (b) añadir iones caprilato y/o heptanoato a la disolución intermedia y mantener el pH entre 4,8 y 4,95, con lo que se forma un precipitado y los anticuerpos están esencialmente presentes en el sobrenadante;
- 10 (c) incubar la disolución sobrenadante tras una segunda adición de iones caprilato y/o heptanoato en las mismas condiciones que en la etapa b), realizar la filtración de la disolución resultante y opcionalmente concentrar y diafiltrar la disolución filtrada antes de ajustar el pH;
- (d) aplicar la disolución filtrada a, al menos, una resina de intercambio de aniones a un pH de entre 5,0 y 5,2 y, opcionalmente, con dos resinas de intercambio de aniones diferentes, que une los contaminantes a la resina y al mismo tiempo no permite la unión de los anticuerpos a la resina, en el que se produce una preparación de anticuerpos purificada, viralmente inactivada y viralmente segura.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se lleva a cabo una segunda cromatografía de intercambio de aniones a un intervalo de pH de 6,7 a 6,9.
3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 y/o 2, en el que las etapas (b) y (c) son repetidas al menos una vez.
4. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la disolución de partida comprende anticuerpos derivados de plasma.
- 20 5. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 4, en el que en la etapa (d) se pone la disolución inactivada en contacto con dos resinas de intercambio de aniones diferentes, de manera tal que los contaminantes se unen de manera selectiva a las resinas mientras que los anticuerpos no se unen a las resinas.
6. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los anticuerpos son inmunoglobulina G.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el pH es ajustado a $\text{pH } 6,8 \pm 0,1$ antes de la segunda cromatografía de intercambio de aniones.
8. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el flujo a través de la cromatografía de intercambio de aniones es concentrado de 60 a 90 mg/ml y es sometido a diafiltración contra una disolución tampón, de preferencia un tampón de fosfato.
- 30 9. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el flujo a través de la primera cromatografía de intercambio de aniones es tratado con disolvente y detergente, de preferencia por TnBP y Triton X-100, más preferentemente por concentraciones de Triton X-100 al 1 % y TnBP al 0,3 % durante 4,5 a 8 horas para inactivar los virus con cubierta lipídica.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que los detergentes de la mezcla de incubación son eliminados por extracción en fase sólida y líquida.
11. El procedimiento de al menos una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que al menos uno de los procedimientos seleccionado del grupo que consiste en tratamiento con UVC, tratamiento con calor, filtración de virus y eliminación o inactivación de priones, es combinado con un tratamiento con caprilato de la reivindicación 1.
- 40 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el valor del pH tras la extracción en fase sólida es ajustado a un valor entre 6,7 y 6,9.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la disolución es sometido a la segunda cromatografía de intercambio de aniones.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el valor del pH del flujo a través del intercambiador de aniones es ajustado a un valor entre 3,5 y 4,5, de preferencia a un pH de $4,0 \pm 0,1$.
- 45 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la disolución de IgG es puesta en contacto con un filtro de virus.
16. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la disolución de IgG es puesta en contacto con un nanofiltro.
17. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la disolución de IgG es incubada durante al menos 24 horas, de preferencia a $37^\circ\text{C} \pm 1$.

18. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la disolución de IgG es concentrada al 5 o al 10 %.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la osmolaridad del concentrado es ajustada de 200 a 400 mOsmol/kg.
- 5 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que el pH de la disolución de IgG es ajustada a un valor entre 3,5 y 6,0, de preferencia a un valor de pH entre 4,0 y 5,5,
21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que la disolución de IgG es filtrada de manera estéril y rellenada en frascos de vidrio o envases de plástico.

Figura 1

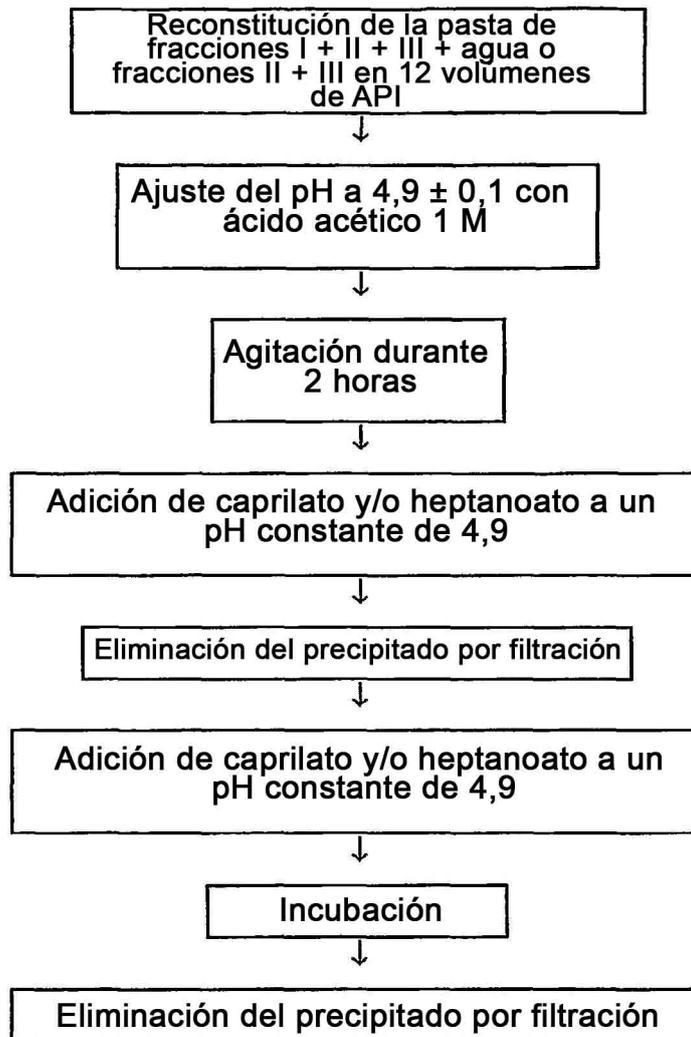
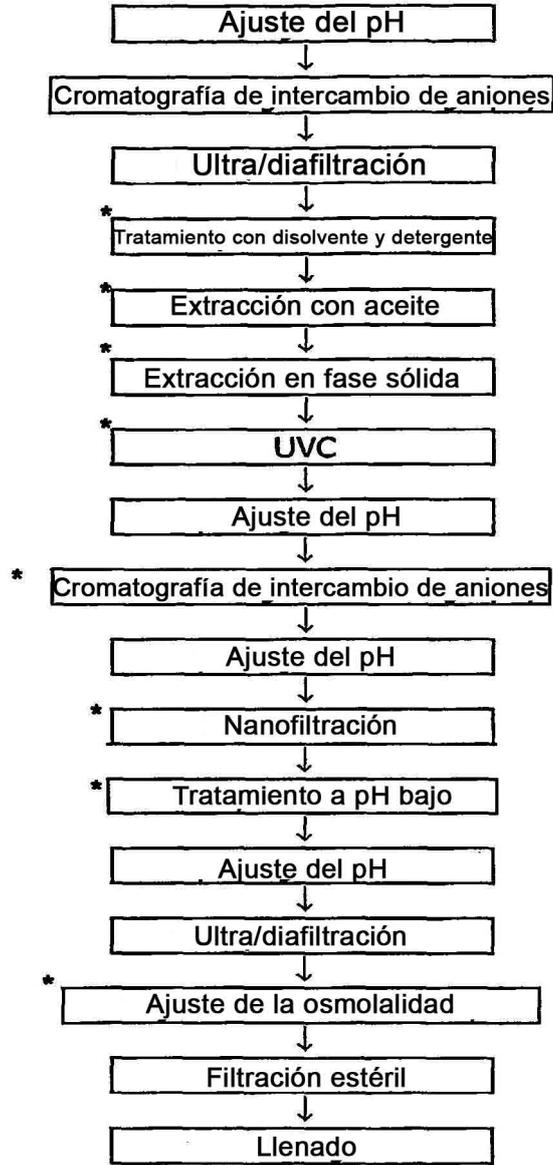


Figura 2



Todos los recuadros con un asterisco son etapas opcionales del proceso.