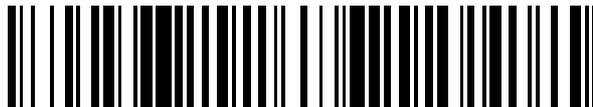


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 476 416**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2006 E 06756239 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 1924602**

54 Título: **Composición de inmunoglobulina intravenosa**

30 Prioridad:

11.08.2005 US 201282

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

14.07.2014

73 Titular/es:

**OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
WEIZMANN SCIENCE PARK 14B EINSTEIN
STREET
NES-ZIONA 74036, IL**

72 Inventor/es:

**NUR, ISRAEL;
BAR, LILIANA y
LAUB, ORGAD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 476 416 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de inmunoglobulina intravenosa

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición de inmunoglobulina intravenosa, a un procedimiento para su preparación, a formas de productos que la contienen y a usos terapéuticos de la composición.

Antecedentes de la invención

10 La vacuna de la viruela contiene virus de la vaccinia vivo, un virus de la familia de Ortopoxvirus que está estrechamente relacionado con el virus de la viruela, el agente que causa la viruela. Los anticuerpos neutralizantes inducidos por la vacuna de la vaccinia presentan protección cruzada para otros ortopoxvirus. Aunque no se ha demostrado nunca la eficacia de la vaccinia en pruebas controladas, los estudios epidemiológicos sí mostraron un mayor nivel de protección frente a la viruela, que persiste durante 5 años o menos tras la vacunación primaria, y una inmunidad substancial, aunque decreciente, que puede persistir durante más de 10 años. Los niveles de anticuerpos tras la revacunación pueden permanecer elevados durante más tiempo, confiriendo un mayor período de inmunidad que el que se produce únicamente tras la vacunación primaria.

15 Para la mayoría de las personas, la vacuna de la vaccinia es segura y efectiva. En una persona no inmune que no está inmunocomprometida, la respuesta esperada a la vacunación primaria es el desarrollo de una pápula en el sitio de vacunación 2-5 días después de la administración percutánea de la vacuna de la vaccinia. La pápula se vuelve vesicular y luego pustular y alcanza su tamaño máximo en 8-10 días. La pústula se seca y forma una costra, que se separa en 14-21 días después de la vacunación, dejando una cicatriz.

20 La mayoría de las personas experimentan reacciones normales, típicamente leves, a la vacuna, como hinchazón y sensibilidad de los nódulos linfáticos regionales, fiebre, erupciones eritematosas o de urticaria e inoculación accidental. La mayoría de éstos se resuelven sin ningún tratamiento.

25 Algunas personas pueden experimentar reacciones moderadas o severas, que pueden requerir atención médica. Estas complicaciones son raras, pero se producen al menos 10 veces con más frecuencia entre los vacunados por primera vez que entre los revacunados y son más frecuentes entre niños menores de un año y sujetos inmunocomprometidos que entre niños de más edad y adultos. En el pasado, entre 14 y 52 sujetos por millón de personas vacunadas por primera vez experimentaban reacciones potencialmente mortales.

Las siguientes complicaciones de la vacunación con vaccinia requieren atención médica:

30 Eczema vacunal: Erupciones cutáneas serias causadas por infección extendida de la piel. Se produce en pacientes con historia de eczema o dermatitis atópica. Las lesiones comienzan a aparecer en sitios distantes a medida que el virus se propaga por el organismo. Normalmente, la enfermedad es leve y autolimitante, pero puede ser grave o fatal. Los casos más serios entre los receptores de la vacuna se producen entre los vacunados por primera vez y son independientes de la actividad del eczema subyacente.

35 Vaccinia progresiva (o vaccinia necrosum): Infección progresiva de la piel con necrosis tisular progresiva. La lesión puede progresar durante meses y se pueden desarrollar lesiones secundarias en cualquier otro lugar del cuerpo. La infección es más común en vacunados por primera vez, sujetos inmunocomprometidos y niños y es frecuentemente fatal. La aparición de esta complicación estaba influenciada por la cepa del virus vacunal y era mayor en Europa que en los EE.UU.

40 Vaccinia generalizada: Se caracteriza por una erupción maculopapular eritematosa difusa indiscriminadamente dispersa por el cuerpo. Las pápulas se convierten en vesículas y se curan en un plazo de 15 días. Se piensa que la vaccinia generalizada se produce como resultado de diseminación circulatoria del virus en individuos normales. La irregularidad de las lesiones y el sistema inmunitario sano de los pacientes afectados diferencian esta enfermedad de la erupción eritematosa y la vaccinia accidental.

45 Encefalitis posvacunal: Inflamación del cerebro. Ésta es una complicación rara y seria y aún se desconoce su relación con el virus de la vaccinia. La encefalitis que se produce en niños menores de 2 años se caracteriza por un período de incubación de 6-10 días y se asocia a cambios degenerativos en las células ganglionares, hemorragia perivascular e hiperemia generalizada del cerebro. Los síntomas son los mismos que los asociados a la encefalitis general, incluyendo presión intracraneal, mielitis, convulsiones y parálisis muscular. Una segunda forma de la enfermedad se produce en niños de más edad y adultos. Ésta se caracteriza por un período de incubación de 11-15 días y se asocia a signos de una respuesta alérgica con desmielinización perivascular. La aparición de esta complicación estaba influenciada por la cepa del virus vacunal y era mayor en Europa que en los EE.UU.

55 Dos efectos adversos emergentes potencialmente fatales de la vacunación contra la viruela son la miopericarditis y los episodios cardíacos isquémicos. Los pacientes que experimentan enfermedad cardíaca después de la vacunación refieren falta de aire, palpitaciones y dolor de pecho. La muerte por infarto de miocardio es una marcada posibilidad.

En base a la experiencia pasada, se estima que entre 1 y 2 personas de cada millón de personas vacunadas pueden morir como resultado de reacciones mortales a la vacuna.

5 Más aún, los sujetos con sistemas inmunitarios debilitados o ciertas afecciones cutáneas tienen más probabilidad de sufrir reacciones severas y son, por lo tanto, excluidos de la vacunación con vaccinia, a menos que hayan estado expuestos al virus de la viruela.

10 La inmunoglobulina intravenosa (IVIg) es un producto médico bien conocido, que consiste en una solución de inmunoglobulina inespecífica obtenida combinando plasma de una pluralidad de individuos. La inmunoglobulina de la vaccinia (VIG) es una solución de inmunoglobulinas obtenidas de plasma recogido de sujetos que fueron vacunados con la vacuna de la viruela. La solución, por lo tanto, contiene un título relativamente alto de anticuerpos antivaccinia.

15 La preparación de VIG comúnmente utilizada era un producto intramuscular (im) (VIG-IM) y era producida por Baxter Healthcare Corporation en los 90. Como contenía una gran proporción de proteínas agregadas, se administraba únicamente por vía intramuscular y no se podía utilizar intravenosamente (iv). Dado que los donantes de plasma no son seleccionados en cuanto a niveles elevados de anticuerpos antivaccinia, la eficacia del tratamiento con VIG es limitada y se necesitan grandes volúmenes o múltiples inyecciones para alcanzar un nivel efectivo.

20 En general, se inyectaba una dosis inicial de 0,6 ml/kg de peso corporal (aproximadamente 100 mg/kg = ~7 g/tratamiento para un adulto) intramuscularmente y se determinaba la administración posterior por el curso de la enfermedad. En la complicación grave de la vaccinia, tal como los casos de eczema vacunal y vaccinia progresiva, se usaban 1-10 ml/kg. Estas grandes dosis son divididas en unidades más pequeñas e inyectadas intramuscularmente en múltiples sitios separadas a lo largo del tiempo.

Después de la reciente amenaza de ataque bioterrorista, se ha hecho un importante esfuerzo por producir VIG para administración intravenosa (VIG-IV). Se pueden adquirir preparaciones de VIG-IV (C-VIG; Cangene, AcambisBaxter; Dyn port). No se está desarrollando actualmente ningún producto similar en la UE. El tratamiento con VIG-IV requiere cuidado médico y, por lo tanto, debe ser administrado dentro del marco de un centro médico.

25 La VIG ha estado indicada para implante accidental que conlleve lesiones extensas, eczema vacunal (EV), vaccinia generalizada (VG) y vaccinia progresiva (VP). No se recomienda la VIG para casos leves de implante accidental, vaccinia generalizada leve o limitada, eritema multiforme o encefalitis posvacunación. La VIG puede también ser útil en el tratamiento de la vaccinia ocular que se produce como resultado de un implante accidental. Cuando hay presencia de vaccinia ocular con queratitis, la consideración de la VIG debería incluir el posible mayor riesgo de cicatrización de la córnea.

30 Se sugirió que la inmunoglobulina de la vaccinia también tiene valor en la profilaxis postexposición de la viruela cuando se da dentro de la primera semana tras la exposición y concurrentemente con vacunación. La vacunación sola está recomendada para quienes no tienen contraindicaciones para la vacuna, a menos que haya transcurrido más de una semana desde la exposición. En este momento, se recomienda la administración de ambos productos, si se dispone de ellos.

35 La Patente EE.UU. N° 4.174.388 (McAleer y col.) desvela inmunoglobulina de la hepatitis B preparada a partir de individuos que exhiben un aumento en el anticuerpo para la superficie de la hepatitis B de al menos 2.000 unidades PHA/ml tras inmunización con antígeno de la superficie de la hepatitis B.

40 La Patente EE.UU. N° 4.617.379 (Dobkin y col.) desvela la preparación de globulina de suero hiperinmune para citomegalovirus (CMV). Se prepara la globulina sérica a partir de plasma fresco normal de donantes que no han sido vacunados con una vacuna para CMV y que han sido cribados en cuanto a títulos superiores a los normales de anticuerpo para CMV. Se reúne el plasma que contiene un título elevado de anticuerpo para CMV y se fracciona para obtener el producto.

45 La Patente EE.UU. N° 6,692,739 (Patti y col.) desvela un procedimiento y una composición para la inmunización pasiva de pacientes infectados con, o susceptibles de tener una infección por, bacterias Staphylococcus. Se prepara la composición a partir de un pool de plasma de donantes obtenido combinando muestras individuales de sangre o de componentes de la sangre que tienen títulos superiores a los normales de anticuerpos naturales para un antígeno de las bacterias Staphylococcus. Se obtienen las muestras de sangre o de componentes de la sangre a partir de una población normal no vacunada. En una realización alternativa, se administran proteínas o péptidos seleccionados a un huésped para inducir la expresión de anticuerpos deseados, se recupera el pool de suero o plasma de título elevado aumentado del huésped y se administra este pool a un paciente que lo necesite, eventualmente tras purificación y concentración.

55 WO 03/049117 desvela una inmunoglobulina inyectable por vía intravenosa que tiene un elevado título de anticuerpo para Ortopoxvirus. Se prepara la inmunoglobulina vacunando a una pluralidad de donantes con una vacuna de Ortopoxvirus, aislando el plasma de cada uno de los donantes después de un período de tiempo suficiente para permitir la producción de anticuerpos contra la vacuna del Ortopoxvirus y preparando una inmunoglobulina inyectable por vía intravenosa a partir del plasma. También se desvela un procedimiento para tratar o prevenir una

infección por Ortopoxvirus y un procedimiento de tratamiento o mejoramiento de los síntomas asociados a la reacción adversa a la vacunación con Ortopoxvirus.

Resumen de la invención

5 Se ha descubierto, sorprendentemente ahora, que un cierto porcentaje de una población vacunada tiene un título excepcionalmente alto de anticuerpos y que este elevado título se mantiene de manera estable a lo largo del tiempo después de sucesivas plasmaféresis. Se ha aplicado este descubrimiento en la presente invención para obtener un nuevo procedimiento y producto.

10 Así, en un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición concentrada de inmunoglobulinas que tiene un título de anticuerpo igual o superior a 1:60.000.000 determinado por ELISA, para tratar a sujetos vacunados contra, o infectados con, un microorganismo patógeno, que comprende:

- (a) seleccionar donaciones de sangre o plasma obtenidas de una población de individuos previamente revacunados contra uno o más antígenos asociados al microorganismo patógeno;
- (b) determinar el nivel de anticuerpos específicos inmunorreactivos con dicho microorganismo patógeno por medio de un inmunoensayo ELISA en dichas donaciones de sangre o plasma de dichos individuos, para 15 identificar a individuos de título muy alto que tienen un título muy alto de dichos anticuerpos específicos;
- (c) combinar la sangre o los componentes de la sangre que comprenden inmunoglobulinas sólo procedentes de dichos individuos de título muy alto, y
- (d) purificar y/o concentrar el producto de la etapa (c), para obtener una composición concentrada de inmunoglobulinas,

20 en el que dichos individuos de título muy alto son los que dan una mayor respuesta y que constituyen un 10-15% de dicha población revacunada de a), en el que dicho microorganismo patógeno es un virus de la vaccinia.

25 En una realización preferida de la invención, el procedimiento comprende además la etapa de alicuotar la composición concentrada de inmunoglobulinas en una forma de dosificación unitaria de poco volumen. En una realización más preferida, la forma de dosificación unitaria de poco volumen incluye un vial o una jeringa precargada. El uso de un volumen pequeño reduce significativamente el riesgo de efectos colaterales y hace que el producto sea más fácil de administrar.

En la presente memoria descriptiva, se utilizarán a veces términos que deberán entenderse según las siguientes definiciones:

30 **Componente de la sangre** - una fracción de sangre entera que comprende inmunoglobulinas. Un componente de la sangre preferido es el plasma.

Anticuerpos específicos - anticuerpos que tienen una especificidad de unión para un antígeno particular sobre otros antígenos. Aunque puede existir reactividad cruzada, los anticuerpos específicos tienen una afinidad de unión significativamente mayor para el antígeno especificado. Un ejemplo son anticuerpos que se unen a un 35 antígeno asociado al virus de la vaccinia.

Título muy alto - alta concentración de anticuerpos específicos en una solución de inmunoglobulinas, tal como un componente de la sangre, generalmente al menos 5 veces, y preferiblemente 10 veces, superior a la concentración media del anticuerpo específico en una solución de inmunoglobulinas similar en la población general. Un título muy alto preferiblemente se relaciona con un título que es más de 5 veces, y particularmente 40 de 10 veces, superior a la concentración media del anticuerpo específico en una solución de inmunoglobulinas similar obtenida de individuos que han estado previamente expuestos a un antígeno que provoca la producción de dicho anticuerpo específico, tal como por vacunación. Un título muy alto puede ser determinado también midiendo la proporción del anticuerpo específico con respecto al contenido en inmunoglobulinas generales en la solución de inmunoglobulinas, siendo dicha proporción 5 veces y preferiblemente 10 veces superior a la proporción en una solución de inmunoglobulinas con un título medio del anticuerpo específico, y siendo típicamente 5 veces y deseablemente 10 veces superior a la proporción en una solución de inmunoglobulinas obtenida de individuos que han estado previamente expuestos a un antígeno que provoca la producción de dicho anticuerpo específico. En el contexto de la invención, los individuos que han estado previamente expuestos a un antígeno que provoca la producción de dichos anticuerpos específicos son típicamente individuos vacunados 50 contra un microorganismo patógeno, v.g., el virus de la vaccinia.

Individuos con títulos muy altos - individuos cuya sangre contiene un título muy alto de anticuerpos específicos.

Composición concentrada de inmunoglobulinas - una composición que comprende anticuerpos específicos en un título muy alto.

55 **OmriUnidades/ml** - una medida arbitraria del título de anticuerpos, calculada usando el inmunoensayo ELISA que se describe a continuación. En el caso del virus de la vaccinia, 1.000 OmriUnidades representan una cantidad de los anticuerpos específicos en 1 ml de plasma reunido obtenido de una población de 50 individuos vacunados con un antígeno que provoca la producción de los anticuerpos específicos en dichos individuos. Se demostró que, en el caso del virus de la vaccinia, 20-40 OmriUnidades neutralizarán el virus de la vaccinia en un

ensayo de neutralización en aproximadamente un 50%. Más adelante, se describe un ejemplo de dicho ensayo de neutralización (PRNT₅₀ = Ensayo de Neutralización por Reducción de Placa en un 50%).

Forma de dosificación unitaria de poco volumen - una forma de dosificación que puede ser administrada a un paciente en una sola dispensación, normalmente por inyección. En esta forma, el paciente recibe un tratamiento individual completo en una breve administración. Un volumen preferido es inferior a aproximadamente 10 ml, más preferiblemente aproximadamente 5 ml o menos, más preferiblemente aproximadamente 2 ml.

Aproximadamente un 10% de proteína - concentración de proteína de entre el 8 y el 12%, preferiblemente de aproximadamente el 10%.

Un bajo contenido en agregados - menos de un 3% de agregados de proteína en una solución, lo que permite el uso de la solución para administración iv.

Tratamiento de una infección - tratamiento terapéutico y/o profiláctico de la infección.

En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición concentrada de inmunoglobulinas que comprende anticuerpos específicos inmunorreactivos con un microorganismo patógeno, caracterizada por que el título de anticuerpos específicos de la composición es al menos 5 veces superior, y preferiblemente 10 veces superior, al título medio de anticuerpos específicos de una población de individuos previamente vacunados contra uno o más antígenos asociados al microorganismo patógeno.

Los productos de inmunoglobulinas actuales, tales como la Inmunoglobulina de la Vaccinia (VIG), están hechos usando plasma de donantes revacunados no seleccionados. Eso ha dado como resultado un bajo título de inmunoglobulina específica. Además, debido a su baja concentración, el producto de la técnica anterior ha de ser administrado por infusión intravenosa lenta. En casos de inyecciones intramusculares, el producto (de aproximadamente 40 ml de volumen) ha de ser administrado en diversas localizaciones y a lo largo de varias horas.

Se hará a veces referencia a la composición concentrada de inmunoglobulinas producida según la invención, en relación a una realización preferida en la que el microorganismo patógeno es el virus de la vaccinia, como **VIG-TA** (inmunoglobulina de la vaccinia de título alto), mientras que se hará a veces referencia al producto de inmunoglobulina de la técnica anterior, también en relación a esta realización preferida, como **VIG** (inmunoglobulina de la vaccinia). El procedimiento de la invención permite la selección de muestras de plasma de título muy alto, lo que da como resultado un producto de gran potencia y poco volumen. La sangre o los componentes de la sangre de título muy alto pueden ser repetidamente obtenidos de cada uno de los individuos con títulos altos.

En una realización preferida, el título de anticuerpos específicos de la composición concentrada de inmunoglobulinas de la invención es al menos 5 veces superior, más preferiblemente aproximadamente 10 veces superior, al título medio de anticuerpos específicos de una población de individuos previamente vacunados contra uno o más antígenos asociados al microorganismo patógeno. La composición concentrada de inmunoglobulinas preferiblemente contiene al menos aproximadamente 40.000 OmriUnidades de los anticuerpos específicos. En otra realización preferida, la composición concentrada de inmunoglobulinas contiene al menos aproximadamente un 10% de proteína. La gran potencia de la composición concentrada de inmunoglobulinas le permite ser administrada en un volumen muy pequeño (iv o im) y, por lo tanto, puede ser usada en condiciones de campo por cualquier personal de urgencias entrenado.

Como se ha mencionado anteriormente, el procedimiento de la técnica anterior para el tratamiento o la profilaxis de la infección por microorganismos patógenos se basa en una preparación de VIG producida a partir de plasma no seleccionado de voluntarios revacunados. La realización VIG-TA de la composición de IVIg producida según la invención tiene varias ventajas sobre la VIG actualmente en uso:

- Se espera que la VIG-TA sea aproximadamente diez veces más potente que la VIG regular.
- La VIG-TA desarrollada según la invención puede ser administrada en un pequeño volumen por vía iv o im debido a su elevado título y a su bajo contenido en agregados. A diferencia de la preparación de VIG actual, que es administrada por un doctor en medicina entrenado por vía iv lenta durante la hospitalización, el nuevo producto puede ser usado en condiciones de campo por cualquier personal de urgencias entrenado.
- La nueva VIG-TA puede ser formulada en jeringas precargadas o viales pequeños y fáciles de usar.
- La VIG-TA puede ser usada tanto para el tratamiento de los efectos adversos de la vacunación con vaccinia como a modo de tratamiento profiláctico o terapéutico para la viruela en poblaciones susceptibles.

Después de reunir el plasma de individuos seleccionados, se puede purificar y/o concentrar el pool usando técnicas bien conocidas para el tratamiento de soluciones de inmunoglobulinas. Se desvelan ejemplos de dichas técnicas en la Patente EE.UU. N° 6.468.733 y en la Patente Israelí N° 121.900. El procedimiento desvelado en la anterior patente EE.UU. reduce el nivel de agregados de proteína en la solución concentrada de inmunoglobulina y permite al producto final alcanzar un nivel del 10% de proteína con un bajo nivel de agregados para administración iv.

Por ejemplo, un procedimiento para la purificación de inmunoglobulinas a partir de una solución fuente, tal como la Fracción II de Cohn, puede comprender: (a) pretratar una resina de intercambio catiónico con una solución ácida que tiene un pH de 4,0-4,5; (b) poner en contacto la solución fuente con la resina de intercambio catiónico, y (c) eluir las inmunoglobulinas unidas a la resina de intercambio catiónico. Antes del contacto con la resina de intercambio catiónico, se puede tratar la solución fuente con un solvente orgánico y un detergente.

Aunque se ilustra la invención con respecto al virus de la vaccinia, la invención puede ser llevada a la práctica con respecto a otros microorganismos patógenos, y especialmente otros virus. Como ejemplos de tales microorganismos, se incluyen el virus del Nilo occidental, el bacilo del ántrax, el virus de la rabia, el virus CMV, el virus RSV, el virus de la hepatitis B, el virus de la influenza y microorganismos que segregan botulina y otras toxinas.

- 5 Se espera poder utilizar una composición de inmunoglobulina según la invención no sólo para tratar los efectos adversos de la vacunación, sino también como tratamiento terapéutico o profiláctico en caso de un brote infeccioso.

Por ejemplo, en el caso de la viruela, debido a los riesgos implicados en la vacunación contra la viruela, una proporción significativa de la población quedaría excluida de cualquier programa de vacunación en masa, incluyendo todos los niños menores de dos años de edad, las mujeres gestantes y lactantes, las personas con sistemas inmunitarios debilitados, como los pacientes con inmunodeficiencia primaria o secundaria, y más.

10 En todos los casos anteriores, la necesidad de inmunización pasiva sería crítica durante un brote de viruela. El tratamiento con una composición de inmunoglobulinas según la invención podría, por lo tanto, estar indicado para la inmunización profiláctica pasiva en esta población. Alternativamente, se podría administrar una composición de inmunoglobulinas concomitantemente con la vacunación para minimizar el riesgo de complicaciones en estas subpoblaciones.

Breve descripción de los dibujos

Con objeto de entender la invención y de ver cómo ésta puede ser llevada a cabo en la práctica, se describirá ahora una realización ejemplar, únicamente a modo de ejemplo no limitativo, en relación a los dibujos adjuntos, en los que:

20 La **Fig. 1** es un gráfico que muestra la distribución de los títulos antivaccinia de donantes de plasma recién revacunados (30 días).

Las **Fig. 2 y 3** muestran fluctuaciones en el nivel de los títulos de anticuerpos para vaccinia en dos individuos con títulos altos a lo largo de un período de varios meses.

Descripción detallada de realizaciones ejemplares

A. Preparación de una composición de inmunoglobulinas

- 25 Se detalla a continuación una realización de la preparación de una composición de inmunoglobulinas según la invención.

1) Establecimiento de herramientas de cribado

a. Desarrollo de un procedimiento ELISA

30 Se ha desarrollado un ensayo ELISA competitivo lineal para determinar el título de anticuerpos para vaccinia. Este ensayo tiene dos fines:

1. Cribado de las donaciones de plasma con título alto.
2. Uso eventual como herramienta de valoración posvacunación.

El ELISA es relativamente rápido y en él están implicados relativamente pocos reactivos. Como todos los ELISA de bancos de sangre, el ELISA puede ser realizado sobre una sola dilución con sólo una réplica.

35 Principio de la prueba

Se une un antígeno inactivado de vaccinia a la superficie de pocillos de microtitulación. Se pipetea en los pocillos muestras sospechosas de contener la inmunoglobulina G específica (anticuerpos para vaccinia), tales como suero, plasma, inmunoglobulinas purificadas y concentradas, patrones de calibración o controles, y se incuban a 37°C. Los anticuerpos para vaccinia, si están presentes, se unen al antígeno inmovilizado. Se elimina el material no unido en una etapa de lavado. En una segunda etapa, se añade a los pocillos un conjugado de IgG de cabra antihumana y fosfatasa alcalina y se incuba la placa de ELISA a 37°C. Después de la incubación, se elimina el conjugado no unido por lavado. Se mide entonces la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina por su reacción con el sustrato fosfato de p-nitrofenilo. Se hace la medición en un lector de ELISA a 405 nm. Existe una relación directa entre la densidad óptica observada y el título de anticuerpos para vaccinia.

45 Manejo de los especímenes

Se debe realizar la recogida de sangre según las prácticas actuales. El suero o el plasma deben ser separados lo antes posible para evitar cualquier hemólisis. Se pueden guardar los especímenes durante 7 días a 2-8°C antes de su uso. Para un almacenamiento más prolongado, se congelan los especímenes a -20°C o a una temperatura más fría.

50

Evitar congelar y descongelar repetidamente. Los especímenes con material particulado observable, o después de haberse descongelado las muestras, deben ser centrifugados antes de realizar las pruebas.

Preparación de la solución de lavado

5 Un día antes de iniciar el procedimiento ELISA, se prepara una solución de trabajo añadiendo la totalidad de los contenidos de una botella de concentrado de lavado de 50 ml (R1) a 450 ml de agua destilada y mezclando durante la noche a temperatura ambiente hasta una completa disolución. Se puede guardar la solución de lavado preparada a 2-8°C durante hasta 1 mes. Se preparan 500 ml para una placa de 12 pistas.

Procedimiento de ensayo

Dilución de la muestra y de los patrones

10 Utilizando tubos de ensayo adecuados y una placa de microtitulación, se diluyen las muestras y los controles patrón como sigue:

- a. Muestras de ensayo: Primeramente, se hace una dilución inicial de 1:100 (10 µl de muestra en 990 µl de diluyente de muestras R2). A continuación, volver a diluir las muestras a 1:300 (150 µl de la dilución 1:100 en 300 µl de diluyente de muestras R2) y 1:1200 (100 µl de la dilución 1:300 en 300 µl de diluyente de muestras R2).
- 15 b. Se debe diluir el calibrador patrón (R3) a 1:700, 1:1000, 1:1500, 1:3000 y 1:6000 en diluyente de muestras R2. Usar una dilución inicial de 1:100 (10 µl de calibrador en 990 µl de diluyente R2) y seguir diluyendo luego para alcanzar las diluciones anteriores (50 µl en 300 µl, 50 µl en 450 µl, 50 µl en 700 µl, 50 µl en 1.450 µl y 50 µl en 2.950 µl de diluyente de muestras R2, respectivamente).
- c. Se debe diluir el control negativo patrón (R4) a 1:300: 10 µl en 2,99 ml de diluyente de muestras R2.
- 20 d. Se debe diluir el control positivo (R9) a 1:500: 10 µl de R9 en 4,99 ml de diluyente de muestras R2.

Procedimiento del ensayo ELISA

1. Se pipetea 100 µl de muestras prediluidas, calibrador patrón (**Calibrador**), control negativo (**ContNeg**) y control positivo (**ContPos**) en sus respectivos micropocillos de las pistas de ensayo según el esquema que se da a continuación. Los calibradores patrón han de ser añadidos por duplicado. Se añaden 100 µl de diluyente de muestras (R2) a 2 pocillos para su uso como **Bancos**.

25

	1	2	3	4
A	Calibrador 1:700	Calibrador 1:700	Muestra 1 1:300	Muestra 1 1:1200
B	Calibrador 1:1000	Calibrador 1:1000	Muestra 2 1:300	Muestra 2 1:1200
C	Calibrador 1:1500	Calibrador 1:1500	Muestra 3 1:300	Muestra 3 1:1200
D	Calibrador 1:3000	Calibrador 1:3000	Muestra 4 1:300	Muestra 4 1:1200
E	Calibrador 1:6000	Calibrador 1:6000	Muestra 5 1:300	Muestra 5 1:1200
F	ContNeg 1:300	ContNeg 1:300	Muestra 6 1:300	Muestra 6 1:1200
G	Blanco	Blanco	Muestra 7 1:300	Muestra 7 1:1200
H	ContPos 1:500	ContPos 1:500	Muestra 8 1:300	Muestra 8 1:1200

- 2. Se cubren las pistas con la cubierta de plástico y se incuban a 37°C durante 1 hora.
- 3. Durante la incubación, se prepara la solución de conjugado diluyendo el conjugado concentrado (R6) a 1:14 en el diluyente de conjugado (R5). Se diluye el conjugado según el número de pistas en uso: Para una pista: 70 µl en 930 µl de diluyente; para dos pistas: 140 µl en 1.860 µl de diluyente; para tres pistas: 215 µl en 2.800 µl de diluyente.
- 30 4. Al final de la incubación, se retira la película adhesiva y, utilizando un lavador de placas automatizado, se vacían todos los pocillos por aspiración y se lavan seis veces (200 µl/pocillo) con solución de lavado diluida. Al completar los lavados, hay que asegurarse de que se ha eliminado toda la solución de lavado.
- 35 5. Se dispensan en cada pocillo 100 µl de la solución de conjugado. Se cubren las pistas (véase la etapa 2) y se incuban a 37°C durante 1 hora.
- 6. Al finalizar la incubación, se aspira el contenido de los pocillos y se lavan como se describe en la etapa 4.
- 7. Se dispensan rápidamente en cada pocillo 100 µl de solución de sustrato. Se cubren las pistas con papel de aluminio y se incuban durante 45 minutos a temperatura ambiente.
- 8. Se detiene la reacción añadiendo 50 µl de solución de parada (R8) a cada pocillo.
- 40 9. Se limpia cuidadosamente el fondo de la placa. Se lee la absorbancia (DO) de los pocillos a 405 nm usando un lector de microplacas ELISA en los 15 minutos siguientes a la detención de la reacción. *Nota: Agitar bien las pistas antes de realizar la lectura.*

Cálculo e interpretación de los resultados

1. Se calcula el valor de la DO media para todas las réplicas y se resta la lectura de la DO media del Blanco de todos los resultados. Para que la prueba sea válida, las siguientes condiciones deben ser ciertas: (a) la lectura media del control negativo debe ser inferior a la lectura de la dilución 1:700 del calibrador patrón; (b) la lectura media del control negativo debe ser inferior a la lectura de la dilución 1:500 del control positivo.
2. Se representan los valores de DO netos a 405 nm obtenidos para las diluciones del calibrador patrón (en el eje de las Y) frente a las concentraciones de estas diluciones en OmriU/ml (en el eje de las X), donde: la dilución 1:700 corresponde a 2,1 OmriU/ml; la dilución 1:1000 corresponde a 1,5 OmriU/ml; la dilución 1:1500 corresponde a 1,0 OmriU/ml; la dilución 1:3000 corresponde a 0,5 OmriU/ml, y la dilución 1:6000 corresponde a 0,25 OmriU/ml. El rango lineal debe ser 0,3 - 1,5 OmriU/ml.
3. Se determina el título de anticuerpos para vaccinia de las muestras de ensayo por interpolación a partir de la curva de calibración y multiplicando ese valor por el factor de dilución de la muestra.
4. Se determina el título del control positivo (R9) según lo anterior. La totalidad del procedimiento de ensayo es válido sólo si el título de R9 es de entre 400 y 600 OmriU/ml.

Interpretación de los resultados

Se puede clasificar a un sujeto inmunizado con vaccinia en una de las cuatro categorías siguientes:

- Respondedor muy bajo: < 90 OmriU/ml
- Respondedor bajo: 90 - 440 OmriU/ml
- Respondedor medio: 450 - 1.800 OmriU/ml
- Respondedor alto (hiperinmune): > 1.800 OmriU/ml

Por consiguiente, y alternativamente, los resultados pueden ser interpretados empleando la tabla siguiente:

Para dilución de la muestra	Para el título de la muestra determinado a partir de la curva de calibración de (en OmriU/ml):			
1:300	<0,3	0,3-1,5	>1,5	>1,5
1:1200	<0,3	<0,3	0,3-1,5	>1,5
La respuesta puede ser clasificada como:	Muy baja <90 OmriU/ml	Baja 90-440 OmriU/ml	Media 450-1.800 OmriU/ml	Alta >1.800 OmriU/ml
<i>Nota:</i>				
a. En la mayoría de los casos, sólo una de las dos diluciones dará como resultado un valor dentro del rango lineal (0,3-1,5 OmriU/ml). Sin embargo, en caso de que ambas diluciones den lugar a un valor dentro del rango lineal, la muestra deberá ser considerada como un respondedor bajo.				
b. La clasificación de las categorías de respuesta a la vacuna es tentativa y se basa en el programa de vacunación israelí. Sin embargo, una población puede reaccionar de manera diferente en otros programas de vacunación y/o con una preparación de vacuna diferente. Por lo tanto, el esquema final de interpretación será determinado después del estudio clínico.				

Referencias:

1. Centers for Disease Control and Prevention. Vaccinia (smallpox) vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2001. MMWR Recomm. Rep. 22 jun. 2001; 50 (RR-10): 1-25.
2. Frey S.E., Newman F.K., Yan L., Belshe R.B. (2003) Response to Smallpox Vaccine in persons immunized in the distant past. JAMA 289(24): 3295-3299.
3. Henderson D.A. (1999) Smallpox: clinical and epidemiologic features. Emerg. Infect. Dis. 5: 537-539.
4. Henderson D.A. y col. (1999) Smallpox as a Biological Weapon. JAMA 281(22): 2121-2137.
5. WHO (2001) Smallpox. Weekly Epidemiological Record 76(44): 337-344.
6. WHO Recommendations for Production and Control of Smallpox Vaccine (2004). WHO Expert Committee on Biological Standardization 53rd Meeting, 17-21 de febrero de 2003. Final Report.

ELISA permite hacer una cuantificación continua lineal de antivaccinia generando una relación directa entre la densidad óptica observada a 405 nm y la concentración de anticuerpos para vaccinia en plasma y suero. Se usa 1 ml de pool de plasma derivado de 50 donantes vacunados como patrón positivo y se le asigna un valor de 1.000 unidades arbitrarias (=1.000 OmriUnidades), como se describe más adelante en el Ejemplo 1.

2) Se realizó la validación de un kit de ensayo de anticuerpos antivaccinia como sigue:

1. Pruebas internas de estabilidad acelerada, precisión, sensibilidad, especificidad y recuperación con especímenes negativos, positivos, patrón y de bancos de sangre. Se realizaron con al menos tres lotes de producción del producto (kit de diagnóstico).
2. Se contrataron bancos de sangre adecuados para realizar pruebas de validación de campo. Se suministraron kits de lotes de producción a esos establecimientos y se proporcionó entrenamiento interno de la operación de los kits de ensayo. Se pidió el banco de sangre que estudiara grupos de especímenes patrón y preestudiados

(tanto negativos como positivos) con objeto de validar la apropiada operación de los kits de ensayo.

5 3. Tras cumplir satisfactoriamente con el punto (2) anterior, se pidió a cada banco de sangre que estudiara 150 especímenes de donantes seleccionados aleatoriamente. Se estudiaron esos especímenes paralelamente a un kit de ensayo de referencia. Si los resultados de ensayo del kit de ensayo de la compañía de diagnóstico y del ensayo de referencia eran concordantes, se aprobó el kit para el ensayo de rutina de unidades de sangre de donantes.

3) Equivalencia con el procedimiento de neutralización sérica

10 La regla de oro para medir la actividad biológica (inactivación vírica) de anticuerpos antivíricos es el *ensayo de neutralización vírica*. Se define la neutralización de un virus como la pérdida de infectividad por reacción del virus con un anticuerpo específico. Se produce la pérdida de infectividad por interferencia del anticuerpo unido con cualquiera de las etapas que conducen a la liberación del genoma vírico en las células huésped.

En este ensayo, se deja que una dosis predeterminada constante de virus (400-600 UFP/ml) reaccione con diversas diluciones de la muestra neutralizante (plasma o inmunoglobulina intravenosa) y se inocula luego en cultivo celular.

15 El Título de Neutralización por Reducción de Placa del 50% (PRNT₅₀) es una prueba específica y sensible que cuantifica la dilución de la muestra que da una reducción del 50% en las placas en relación al pocillo del control del virus. Se basa en el hecho de que el virus de la vaccinia produce efectos citopáticos (ECP), que pueden observarse como placas en cultivo de células BS-C-1. Este ECP es neutralizado por la presencia de anticuerpos específicos.

20 En este ensayo, se mezcla una carga vírica dada con una serie de dilución de muestras de plasma o de suero durante un tiempo dado, después del cual se plaquea entonces la serie de dilución sobre la línea celular de cultivo de tejidos del huésped del virus. Después de 48-72 horas, se cuenta el número de placas víricas. Se calcula la media geométrica del número de placas a partir de la serie de dilución, al igual que el recuento vírico del plasma control sin los anticuerpos específicos. Los recuentos víricos sin el control dan lugar a un número que se denomina Inhibición por Neutralización 50 - la dilución de plasma o suero que da una reducción del 50% en el título vírico.

25 El ensayo es muy engorroso, lleva al menos 4 días de trabajo y no se adapta a una gran producción de muestras. Requiere un laboratorio virológico totalmente equipado con capacidades de cultivo continuo de virus y de células en un ambiente de control altamente clasificado. Por lo tanto, el equipamiento, el ambiente y los conocimientos técnicos están muy por encima de lo que se puede encontrar en los bancos de sangre convencionales.

Instrumentos y materiales

1. Instrumentos

- 30 1.1 Pipetas de 1, 2, 5, 10 y 20 ml, estériles, para cultivo de células
 1.2 Placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos
 1.3 Matraces de 75 cm²
 1.4 Incubadora con camisa de agua a 37°C y con un 5% de CO₂
 1.5 Sistema de filtro, acetato de celulosa de 0,22 μm
 35 1.6 Bomba
 1.7 Campana de flujo laminar
 1.8 Filtro de 0,8/0,2 μm, 32 mm de diámetro, Supor (Gelman, producto # 4658)
 1.9 Microscopio
 1.10 Baño de agua a 37°C
 40 1.11 Tubos de plástico
 1.12 Vórtex
 1.13 Campana química
 1.14 Incubadora a 37°C
 1.15 Filtro plegable
 45 1.16 Almohadilla de gasa

2. Reactivos

- 2.1 Medio de crecimiento: MEM-de Earle, sin L-glutamina (Medio Esencial Mínimo de Eagle, Biological Industries Beit Haemek, cat. # 01-025-1)
 2.2 Suero de ternera fetal (FCS) (Biological Industries Beit Haemek, cat. # 04-121-1)
 50 2.3 L-Glutamina en solución salina, 20 milimoles (Biological Industries Beit Haemek, cat. # 03-020-1)
 2.4 Solución de penicilina (10.000 U/ml)-estreptomicina (10 mg/ml)-anfotericina B (25 μg/ml) (Biological Industries Beit Haemek, cat. # 03-033-1)
 2.5 Solución de bicarbonato de sodio al 7,5% (Biological Industries Beit Haemek, cat. # 03-040-1)
 2.6 Solución de aminoácidos no esenciales (Biological Industries Beit Haemek, cat. # 01-340-1)
 55 2.7 Solución de piruvato de sodio 100 mM (Biological Industries Beit Haemek, cat. # 03-042-1)
 2.8 Solución de tripsina EDTA (0,25% de tripsina) (Biological Industries Beit Haemek, cat. # 03-050-1)
 2.9 Sulfóxido de dimetilo (DMSO) (Sigma, cat. # D2650)

- 2.10 Goma de tragacanto (Sigma, cat. # G-1128)
- 2.11 Etanol (Riedel de Haen, cat. # 32221)
- 2.12 Fucsina básica, Pararosanilina (Sigma, cat. # P1528)
- 2.13 Fenol (Sigma, cat. # P-4557)

5 2.14 Medio de crecimiento: MEM (de Earle) 2X, sin L-glutamina (Medio Esencial Mínimo de Eagle, Biological Industries Beit Haemek, cat. # 01-025-9)

3. Células y virus

Células BS-C-1: (ATCC - CCL-26) Línea celular continua de epitelio de riñón de *Cercopithecus aethiops* (mono verde africano), ATCC Lote # 1182351. Se mantienen las células según el SOP # 08030105.

10 **Vaccinia (cepa IHD): (ATCC VR-156):** Vaccinia pertenece a la familia de los poxvirus, género ortopoxvirus. Viriones envueltos, ligeramente pleomórficos, ovoides o en forma de ladrillo, de 140-260 nm de diámetro y de 220-450 nm de longitud. Compuesto por una cubierta externa que contiene estructuras lipídicas y proteicas tubulares o globulares que encierran uno o dos cuerpos laterales y un núcleo, que contiene el genoma. Los viriones contienen una molécula de ADN lineal de doble hélice.

15 4. Preparación de las soluciones

4.1 Medio de dilución - MEME, 2% de FCS

20 El medio está constituido por MEM con la adición de 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 1,5 g/l de bicarbonato de sodio, un 1% de solución de penicilina-estreptomicina-anfotericina B y un 2% de FCS. Se trabaja en condiciones estériles. Se añaden a 230 ml de MEM 2,5 ml de L-glutamina, 2,5 ml de piruvato de sodio, 2,5 ml de aminoácidos no esenciales, 5 ml de bicarbonato de sodio, 2,5 ml de solución de penicilina-estreptomicina-anfotericina B y 5 ml de FCS, respectivamente. Se filtra a través de un sistema de filtro de 250 ml de acetato de celulosa de 0,2. El medio es estable durante un mes a 2-8°C si no se contamina. Antes de la adición del medio a las células, se lleva el medio a 37°C usando un baño de agua.

4.2 Medio de recubrimiento - MEME 2X, 4% de FCS

25 El medio está constituido por MEM 2X con la adición de 4 mM de L-glutamina, un 1% de solución de penicilina-estreptomicina-anfotericina B y un 4% de FCS. Se trabaja en condiciones estériles. Se añaden a 230 ml de MEM 2X 5 ml de L-glutamina, 2,5 ml de solución de penicilina-estreptomicina-anfotericina B y 10 ml de FCS, respectivamente. Se filtra a través de un sistema de filtro de 250 ml de acetato de celulosa de 0,2 m. El medio es estable durante un mes a 2-8°C si no se contamina. Antes de la adición del medio a las células, se añade un 2,4% de bicarbonato de sodio y se lleva el medio a 37°C usando un baño de agua.

4.3 Medio de recubrimiento - tragacanto

4.3.1 Limpieza del tragacanto

35 Se transfieren a un vaso de precipitados con 60 ml de EtOH 20 g de tragacanto. Se agita el tragacanto hasta alcanzar una suspensión homogénea (15 min.). Se espera hasta que se produce decantación y se desecha el sobrenadante.

Se repite la agitación 3 veces. Se seca la torta de tragacanto usando un filtro plegado y poniéndola luego en una incubadora a 37°C durante 3 h. Se pasa a través de una almohadilla de gasa. Se guarda a TA.

4.3.2 Elaboración del medio de tragacanto

40 Se disuelven 8 g de tragacanto limpio en 1.000 ml de agua purificada durante 2 h a 70°C. Se lleva el volumen final a 1.000 ml con agua purificada y se autoclava luego a 120°C durante 30 min. Se debe alicuotar la solución de tragacanto en viales de 50 ml en condiciones estériles. Se guarda durante un tiempo de hasta dos años a 2-8°C.

4.4 Solución de tinción - fucsina

45 Se prepara fenol al 5% añadiendo 50 ml de fenol a 950 ml de agua purificada. Se prepara una solución al 3% de fucsina disolviendo 3 g de fucsina en 100 ml de EtOH. Se mezclan bien las soluciones de 100 ml de fucsina y 1 l de fenol. Se guardan a TA durante hasta 2 años. Se protegen de la luz con papel de aluminio.

5. Método

La duración de un ensayo de neutralización es de 5 días, y está constituido por las siguientes etapas:

- Día 1: Siembra de células BS-C-1, que fueron cultivadas como se describe en el SOP # 08030105, sobre una placa de 6 pocillos (sección 5.1).
- 50 Día 2: Ensayo de neutralización del virus (sección 5.2).

Día 5: Tinción de las células y determinación de PRNT₅₀ (sección 5.3).

5.1 Siembra de células BS-C-1 (día 1)

Se siembran células BS-C-1 (pases 4-40) sobre una placa de 6 pocillos a una concentración de 4×10^5 células/pocillo (según el SOP #08030105). Las células deben alcanzar la confluencia al día siguiente para el ensayo de neutralización del virus (día 2).

5.2 Ensayo de neutralización del virus (día 2)

5.2.1 Preparaciones de las muestras

5.2.1.1 Se prepara un pool de virus de la vaccinia en medio de crecimiento, MEME con un 2% de FCS, a una concentración final de entre 800 y 1.200 ufp/ml.

5.2.1.2 Se preparan diluciones seriadas de la muestra en medio de crecimiento, MEME con un 2% de FCS, en un rango de 1/40-1/40960. Se deben inactivar las muestras de plasma y de suero a 56°C durante 30 min.

5.2.1.3 Se mezcla cada dilución de IVIg con igual volumen del pool de vaccinia, para obtener así una dilución final de 1/80-1/81920 para IVIg y una concentración final de 400-600 ufp/ml para el pool de virus de la vaccinia (v.g., 500 µl de IVIg diluida a 1/40 con 500 µl de 800-1.200 ufp/ml de virus de la vaccinia dan una dilución final de IVIg de 1/80 y 400-600 ufp/ml de vaccinia).

5.2.2 Preparaciones de los controles

Control de virus: Pool de virus de la vaccinia diluido con medio de cultivo a 1:1.

Controles negativos (no hay reducción de placas):

Control de medio: Medio de crecimiento, MEME con un 2% de FCS.

IVIg (para el ensayo de IVIg): Se mezcla OmriGam al 5%, lote # F18132 (fabricado a partir de un plasma de origen americano) a una dilución de 1/40 con igual volumen del pool de virus de la vaccinia, para obtener así una dilución final de 1/80 para OmriGam al 5% y una concentración final de 400-600 ufp/ml para el pool del virus de la vaccinia.

Plasma (para el ensayo de plasma): Se mezcla un lote de plasma negativo a una dilución de 1/40 con igual volumen del pool de virus de la vaccinia, para obtener así una dilución final de 1/80 para el plasma y una concentración final de 400-600 ufp/ml para el pool de virus de la vaccinia.

Suero (para el ensayo de suero): Se mezcla un suero negativo a una dilución de 1/40 con igual volumen del pool de virus de la vaccinia, para obtener así una dilución final de 1/80 para el suero y una concentración final de 400-600 ufp/ml para el pool de virus de la vaccinia.

Control positivo (reducción de placas):

Se mezcla una muestra positiva a una dilución de 1/40 con igual volumen del pool de virus de la vaccinia, para obtener así una dilución final de 1/80 para la muestra positiva y una concentración final de 400-600 ufp/ml para el pool de virus de la vaccinia.

Rodar todas las mezclas de IVIg y los controles durante 90 min. a 37°C.

5.2.3 Inoculación del virus (día 2)

5.2.3.1 Después de 90 min. de incubación, se observan las monocapas de células BS-C-1 (que fueron preparadas el día 1), que deben ser sanas y confluentes.

5.2.3.2 Desechar el medio de cada pocillo.

5.2.3.3 Añadir cuidadosamente 0,2 ml de mezclas de muestras y controles a los pocillos y mecer suavemente la placa para conseguir una distribución uniforme de los inóculos.

5.2.3.4 Dejar que el virus de la vaccinia no neutralizado se adsorba durante 60 min. a 37°C en la incubadora de CO₂.

5.2.3.5 Combinar el medio de crecimiento (MEM x2 con un 4% de FCS) y la solución de tragacanto (1:1) y añadir un 2,4% de bicarbonato de sodio.

5.2.3.6 Añadir 3 ml del medio de tragacanto a cada pocillo.

5.2.3.7 Incubar la placa en una incubadora a 37°C durante 72 h.

5.3 Tinción celular y determinación de PRNT₅₀ (día 5)

5.3.1 Se examina la placa con un microscopio para la observación de células lisadas.

5.3.2 El procedimiento de tinción ya no tiene que ser estéril. Debe ser llevado a cabo en una campana química.

5.3.3 Se vacían los pocillos mediante golpeteo suave.

5.3.4 Se añaden 500 µl de EtOH a cada pocillo. Se espera 2 minutos. Extraer la solución de los pocillos mediante golpeteo suave.

5.3.5 Se añaden 500 µl de solución de tinción de fucsina (Sección 4.4) a cada pocillo. Esperar 2 minutos. Extraer la solución de los pocillos mediante golpeteo suave.

5.3.6 Contar el número de placas.

6. Criterios de aceptación del ensayo

- El control de virus debe dar como resultado 80-120 UFP/pocillo.
- El control negativo debe dar como resultado una monocapa uniforme e intacta.
- Los controles negativos de plasma, suero e IVIg deben dar $\geq 80\%$ de las placas del control de virus.
- 5 - El control positivo debe dar $\leq 50\%$ de placas en comparación con el control negativo de plasma, suero o IVIg.

7. Evaluación de los resultados

El PRNT₅₀ (expresado en $\mu\text{g/ml}$) para cada muestra es la concentración de IgG a la que se produce un 50% de neutralización del virus de la vaccinia según se determina por la relación no lineal (curva dosis-respuesta) entre el log de la concentración de IgG (concentración inicial de IgG dividida por la dilución) y el porcentaje de neutralización de placas en relación a la muestra control (tomada como el 100%).

8. Referencias

Virology Methods Manual, Brian W J Mahy y Hillar O Kangro.

4) Estudio piloto

Se realizó un estudio piloto con las Fuerzas de Defensa Israelíes (IDF), que sirvió como modelo para la vacunación y el cribado de donantes de plasma. Tras un análisis completo de los datos, se generó una potencia estadística a partir de la cual se formularon finalmente los criterios de excepción y de exclusión de la donación de plasma, aparte del banco de sangre general. Se realizó la vacunación de los sujetos de las IDF según las directrices CDC (<http://www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/response-plan/index.asp#guideb>). Se utilizaron criterios adicionales que pudieran surgir del análisis completo del estudio piloto en el protocolo de vacunación. Se realizó el cribado de plasma usando las mismas normas que en el estudio piloto, con unos cuantos cambios derivados del análisis estadístico completo de los datos.

Se usó el corte final para la donación hiperinmune de título alto (TA) después de la valoración completa de la variabilidad del título y la estimación del porcentaje de la población que contribuiría al plasma hiperinmune TA. Se ve un ejemplo de variabilidad de donantes en la Fig. 1. Se mantuvo a esta población hiperinmune TA entre el 10-15% de todos los sujetos que mostraron o bien seroconversión, o bien signos clínicos de que la inmunización había sido efectiva. Se realizó la recogida de plasma según las directrices de la FDA y la operación estándar de los bancos de sangre locales. Se sacó provecho repetidamente de los sujetos seleccionados, por ejemplo, utilizando una técnica de plasmaféresis o de donación de plasma (véase, por ejemplo, la Patente EE.UU. 6.692.739).

Los sujetos sin ningún signo clínico fueron excluidos de la donación de plasma. Estos sujetos fueron revacunados. Los signos clínicos son los siguientes:

Una vacunación primaria normal aparece como una pápula después de 3-4 días y progresa rápidamente a una vesícula con eritema circundante hacia el 5^o-6^o día. El centro de la vesícula se deprime y progresa a una pústula bien formada hacia el 8^o-9^o día. Hacia el duodécimo día, o poco después, la pústula se seca y forma una costra marrón, que progresa desde el centro de la pústula hacia la periferia. Después de 2,5 a 3 semanas, la costra se desprende y queda una cicatriz bien formada.

Tabla 2: Tiempos normales de reacción a la vacunación de la vaccinia

Día	Descripción
0	Vacunación
3-4	Pápula
5-6	Vesícula con eritema circundante → vesícula con centro deprimido
8-9	Pústula bien formada
12+	La pústula se seca → costra
17-21	La costra se desprende y revela una cicatriz

Raramente, en algunos individuos previamente no vacunados, técnicas de vacunación aparentemente apropiadas pueden no dar lugar a ninguna reacción. Se debe suponer que el individuo **no** es inmune y se deberán hacer intentos repetidos para conseguir una captación primaria. Se deberán hacer al menos tres intentos, cambiando los sitios de la piel después de un segundo intento sin éxito.

Síntomas sistémicos: Se esperan y normalmente aparecen síntomas sistémicos aproximadamente una semana después de la vacunación. Éstos incluyen:

- Dolor en el sitio de vacunación

- Intenso eritema alrededor del sitio de vacunación
- Malestar
- Linfadenopatía (local)
- Mialgia, dolor de cabeza, escalofríos, náusea, fatiga
- Fiebre

La aparición de estas reacciones normales varía considerable de un estudio a otro. La tabla siguiente enumera los síntomas cubiertos por los estudios y proporciona una indicación del rango:

Tabla 3: Aparición de reacciones a la vacuna de la vaccinia

Reacción	Aparición
Linfadenopatía	25,0-50,0%
Mialgia, dolor de cabeza, escalofríos, náusea, fatiga	0,3-37,0%
Fiebre >37,7°C	2,0-16,0%

- 10 La donación de plasma debe tener lugar cuando la costra de la vacuna se separa de la piel, o 21 días después de la vacunación, lo que se produzca más tarde. Todas las muestras de plasma fueron calificadas según las directrices de la FDA para la seguridad del plasma. Todas las donaciones calificadas fueron cribadas en cuanto a un título alto de vaccinia. Sólo se reunirán donaciones de plasma con títulos mínimos predeterminados de vaccinia para la fraccionación de VIG hiperinmune de TA.
- 15 La recepción de la donación de plasma y la emisión para su fraccionación fueron realizadas según criterios de aceptación preestablecidos. Estos criterios incluyen sólo la utilización de unidades de plasma con títulos de anticuerpos para vaccinia por encima de 1.800 OmriUnidades/ml.

Producción de lotes de VIG hiperinmune de TA

- 20 a. Resuspensión de 10-12 kg de pasta II (equivalentes a 2,5-3,0 kg de inmunoglobulina).
 b. Fabricación de detergente solvente al 10% a granel tratado y de filtros de 20 nanómetros para inmunoglobulina.
 c. Carga del producto en jeringas precargables de 2 ml.

La VIG hiperinmune de TA puede ser caracterizada según la monografía USP para inmunoglobulina intramuscular. También habría que realizar estudios de estabilidad de los envases finales de VIG hiperinmune de TA.

- 25 Lo que viene a continuación es una caracterización de producto de un ejemplo de una composición de inmunoglobulinas (VIG-TA) según la invención.

Composición

VIG-TA es una solución estéril que contiene un 10% de proteína (100 mg en 1 ml de solución de los que al menos un 95% es Inmunoglobulina G Normal Humana), un 10% de maltosa y agua para inyección.

- 30 **Descripción del procedimiento de fabricación**

Se obtiene la VIG-TA por fraccionación de Cohn con etanol frío del plasma.

Seguridad

- 35 Se somete la VIG-TA a una tecnología de eliminación/inactivación vírica, compuesta por 3 etapas de inactivación vírica: La fraccionación de Cohn con etanol frío ha sido validada como etapa primaria de inactivación del virus. La VIG-TA sufre una segunda etapa de inactivación del virus mediante el procedimiento de detergente solvente usando TnBP/Tritón X-100 y una tercera etapa de inactivación mediante nanofiltración a pH 4, lo que hace que VIG-TA sea una inmunoglobulina muy segura.

Forma farmacéutica

- 40 VIG-TA es un líquido transparente o ligeramente opalescente, casi inodoro, de incoloro a amarillo claro, para administración intravenosa o intramuscular.

Tipo de vial

Se realiza la carga estéril del producto en viales siliconizados de vidrio de 10 ml con un volumen de llenado de 4-5 ml o en una jeringa precargada de 4-5 ml.

Condiciones de almacenamiento

Los viales/jeringas deben ser almacenados a una temperatura de entre 2 y 8°C protegidos de la luz.

2. Información específica

PARÁMETROS	LÍMITES
Caracteres	Solución transparente o ligeramente opalescente e incolora o de color amarillo claro.
Ouchterlony	Da una reacción positiva con antisueros de proteínas humanas y una reacción negativa con antisueros de proteínas animales.
IgG por electroforesis en acetato de celulosa	≥ 95%
Contenido en IgG	85 mg/ml-110 mg/ml
Título de anticuerpos para vaccinia	40.000 OU/ml
Antihepatitis A	> 100 UI/ml
Anti-HBsAg	> 0,5 UI/g de IgG
Proteína total	8,3%-1,1% (p/v)
Distribución del tamaño molecular (HPLC)	Monómero y dímero ≥ 90,00% Polímeros y agregados ≤ 3,00%
Actividad anticomplementaria	≤ 1 CH ₅₀ /mg de IgG*
Actividad prekaliceína*	≤ 35 UI/ml*
Hemaglutininas anti-A y anti-B	Las diluciones 1:64 no muestran aglutinación*
Fosfato de tri-n-butilo (GC)	≤ 5,0 µg/ml (ppm)*
Tritón X-100 (HPLC)	≤ 5,0 µg/ml (ppm)*
Contenido en IgA	≤ 0,36 mg/ml
Contenido en IgM	≤ 0,24 mg/ml (≤ 10 mg/dl)
pH	5,1-6,0
Osmolalidad	≥ 240 mOsmol/kg de H ₂ O
Sodio (fotómetro de llama)	< 20 mmol/l
Maltosa	90-110 g/l
Pirógenos (10 ml/kg de conejo)	No pirogénico
Esterilidad (Steritest)	Estéril
Ag HBs	Negativo
Ab VIH	Negativo
Ab VHC	Negativo
ARN del VHC (PCR) en pool de plasma	Negativo

5 B. Recogida, análisis e interpretación de datos

La recogida de datos es un procedimiento directo y puede seguir los Procedimientos Operativos Estándar (SOP) de los bancos de datos locales ya adoptados en cada centro.

Se formularon los cuestionarios de los sujetos para la vacunación y la evaluación del programa de cribado. Se anotaron y supervisaron la recogida de sangre, el almacenamiento y las instrucciones de envío según los SOP. Se formatearon todos los anexos a los protocolos de cribado de vacunación y recogida de plasma en una copia electrónica, así como en papel, para permitir el análisis y la vigilancia por el equipo de Control de Calidad. Se introdujeron los datos en un sistema de base de datos basado en PC (v.g., Paradox) para permitir las consultas en línea y la producción de informes actualizados.

Se realizó todo el análisis estadístico usando un programa estadístico para el PC (v.g., SAS). Se llevaron a cabo pruebas paramétricas estándar para comparar las respuestas sintomáticas y de anticuerpos. El análisis primario incluía datos de seguridad, serológicos y clínicos. Los parámetros para la respuesta a la vacuna incluían datos de reacciones cutáneas clínicas, reacciones normales, efectos adversos, efectos adversos severos y títulos antivaccinia. Aquellos sujetos que tenían títulos por encima del umbral seleccionados como idóneos para la recogida y asignados para la hiperinmunidad fueron incluidos en el análisis preliminar, pero también fueron analizados por

separado en un subanálisis para ver si guardaban correlación con alguno de los parámetros recogidos en el cuestionario de vacunación.

C. Seguridad

5 Las tecnologías de eliminación/inactivación vírica son bien conocidas. Por ejemplo, se desvela una de tales tecnologías en la Patente EE.UU. N° 6.468.733. El producto VIG-TA puede incluir etapas de eliminación vírica según estas tecnologías, tales como nanofiltración y tratamiento con detergentes solventes, que exhiben grandes márgenes de inactivación vírica de todos los virus conocidos, incluyendo los Parvovirus. El detergente solvente era eliminado a través de una resina de eliminación de detergentes solventes específica que tiene la capacidad de unir substancias hidrofóbicas y de cribado molecular de grandes moléculas. El flujo de salida de la columna da una solución de inmunoglobulina que tiene un contenido muy bajo en dímero y polímero, lo que permite un alto rendimiento por nanofiltración. Esto da lugar a una preparación líquida de inmunoglobulina que está desprovista de virus activos, pero que presenta un rendimiento muy elevado. Más aún, el anterior procedimiento puede ser llevado a cabo a un bajo pH, lo que permite además la inactivación de virus que son sensibles a un pH bajo.

15 Se puede realizar el almacenamiento del producto líquido a temperatura ambiente durante al menos dos años en jeringas precargadas listas para su uso. Para tiempos de almacenamiento más largos, el producto puede ser estable durante hasta 3 años a 2-8°C.

D. Resultados

Se realizaron tres estudios relacionados con muestras de donación de plasma israelíes y estadounidenses:

20 El plasma para la fraccionación y la fabricación de inmunoglobulina para vaccinia hiperinmune es normalmente recogido de donantes voluntariamente revacunados. Para comenzar esta investigación, se estudiaron la variabilidad de la inmunoglobulina antivaccinia en las donaciones de plasma y el porcentaje de unidades de plasma adecuadas para preparar el pool.

25 La recogida de donaciones de plasma adecuadas de sujetos revacunados se basa en la manifestación clínica de la vacuna. Por otro lado, la recogida de plasma hiperinmune se basa primariamente en los títulos plasmáticos. Se valoró la correlación entre estos dos procedimientos.

30 La fabricación de hiperinmunoglobulinas conlleva los riesgos inherentes de alcanzar bajos rendimientos, que podrían reducir drásticamente la viabilidad económica de cierta tecnología de fabricación. El altamente sensible ensayo ELISA puede detectar títulos residuales de IgG antivaccinia en pooles de plasma regulares. También puede detectar esta inmunoglobulina G en lotes de inmunoglobulinas intravenosas. Se calculó el rendimiento teórico del procedimiento de producción de VIG. Los resultados indican que el procedimiento de la invención es adecuado para la producción de VIG de título alto.

Ejemplo 1: Cribado de títulos antivaccinia en unidades de plasma donadas por sujetos revacunados

35 **Antecedentes:** Se recogieron donaciones de plasma para la producción de inmunoglobulina intravenosa rica en vaccinia de donantes revacunados durante el programa de urgencias israelí, en el que se vacunó a personal militar y de los servicios sanitarios seleccionado contra la viruela. Dado que la selección de los donantes se basaba exclusivamente en los signos de manifestación clínica y no en los títulos de inmunoglobulinas por seroconversión, se necesitaba una valoración para evaluar los títulos en los pooles de fabricación de plasma.

40 **Métodos:** Se seleccionaron 37 donaciones de plasma aleatoriamente de los 24.000 sujetos que fueron inoculados intradérmicamente 30 días antes con 20 µl del virus de la vaccinia Elstree (título medio, 10⁷ ufp por mililitro). Se monitorizaron las unidades de plasma en cuanto a los títulos de inmunoglobulina antivaccinia usando un ensayo ELISA. Se mezclaron 3 ml de cada una de las donaciones de plasma con las otras muestras y el pool sirvió como patrón positivo. Se asignaron entonces al patrón positivo de pool de plasma 1.000 unidades arbitrarias (1.000 OmriUnidades/ml). 20-40 OmriUnidades neutralizarán el virus de la vaccinia en un 50% en un ensayo de neutralización del tipo antes descrito (el ensayo PRNT₅₀). Se puede obtener el patrón positivo de pool de plasma para vaccinia bajo pedido a OMRIX Biopharmaceuticals, Ltd., Tel Aviv, Israel.

45 **Resultados:** Los resultados están resumidos en la Fig. 1. Se vio que la variabilidad en las unidades de plasma donadas oscilaba entre 26 unidades y 6.530 OmriUnidades. La media calculada era de 971,8 OmriUnidades y la desviación estándar era de 1.349, mientras que la mediana era sólo de 542 OmriUnidades. El resultado de la media calculada coincide con la media de las unidades de plasma experimentalmente mezcladas, lo que indica que la mezcla de diferentes unidades de plasma no difiere de la calculada. Esto indica que el ELISA no sufre las reacciones inhibitorias que con frecuencia se producen cuando se mezclan donaciones de plasma.

50 **Conclusión:** Sólo aproximadamente un 10% de la población tenía títulos significativamente superiores a la media de la donación de plasma recogida de sujetos revacunados. Es evidente que, si sólo se recogen donaciones de plasma con títulos superiores a 1.800 OmriUnidades/ml (donaciones de plasma de título muy alto), el título del pool de plasma hiperinmune sería al menos 5 veces superior al del pool de inmunoglobulina para vaccinia rica regular. Es,

por lo tanto, obvio que es necesario el cribado de la donación de plasma de toda la población revacunada para identificar a individuos con título muy alto que tienen un título muy alto de los anticuerpos específicos.

5 Se encontró que los individuos con título muy alto mantienen de manera estable un título muy alto de anticuerpos específicos. Las Figs. 2 y 3 muestran los títulos de dos individuos con título alto de aproximadamente 3.000 OmriUnidades/ml. Se mantuvo este título incluso 3 meses después de la revacunación y después de casi 20 donaciones de plasma.

Ejemplo 2: Correlación entre respuestas clínicas y seroconversión de la vacunación contra la viruela de adultos revacunados

10 **Antecedentes:** La producción de inmunoglobulina para la vaccinia (VIG) se basa en la recogida de plasma de sujetos adultos recientemente vacunados. Informes recientes indicaban que la respuesta clínica de sujetos naïf era superior al 95%, mientras que informes de los primeros años de la década de los 60 mostraban que la respuesta clínica en niños revacunados es mucho más baja. Se diseñó un experimento clínico para evaluar el porcentaje de respuesta y para valorar la correlación entre la respuesta clínica de los sujetos revacunados y el aumento en los títulos antivaccinia.

15 **Método:** En este estudio prospectivo, simple ciego y aleatorizado, se inocularon intradérmicamente a 157 adultos que habían sido previamente inmunizados 20 µl del virus de la vaccinia Elstree (título medio, 10⁷ ufp por mililitro) usando una aguja hipodérmica, y se cubrió el sitio con un apósito semipermeable. Los sujetos fueron monitorizados en cuanto a la formación de vesículas los días 3-4 y los días 7-9 (una respuesta clínica del éxito en la vacunación) y en cuanto a sucesos adversos durante 30 días tras la inmunización. Se recogieron muestras de suero el día 0 (antes de la vacunación), el día 14 y el día 30 (donación de plasma). Se estudiaron los títulos séricos usando el ELISA cuantitativo lineal.

20 **Resultados:** Los índices de éxito diferían sólo ligeramente entre los respondedores clínicos y los que presentaron seroconversión. Los respondedores clínicos eran un 62,87% - muy similar a los sujetos que demostraron seroconversión (62,42%). Los títulos séricos en todos los sujetos que respondieron se redujeron en una media del 30% entre los días 14 y 30 después de la revacunación. Además de la formación de pústulas, aparecieron sucesos adversos comunes, consistentes con la presencia de una enfermedad vírica aguda, incluyendo la formación de lesiones satélite, linfadenopatía regional, fiebre, dolor de cabeza, náusea, dolores musculares, fatiga y escalofríos, sólo en un pequeño porcentaje de los sujetos.

30 La correlación entre los sujetos que presentaron seroconversión (resultados del día 14 frente al día 0) y la aparición clínica de pústulas los días 7-9 era del 87,74% - muy próximo al porcentaje de correlación encontrado entre los sujetos que presentaron seroconversión que tenían pústulas los días 3-4 y/o los días 7-9 (88,44%).

35 Los títulos séricos el día 0 eran muy variables y se volvieron incluso más variables a medida que los títulos aumentaron después de 14 días. Esta variabilidad aparecía también a los 30 días de la vacunación. Sólo un 10-15 por ciento de los sujetos tenían títulos altos que serían adecuados para producción de inmunoglobulina para vaccinia hiperinmune.

40 **Conclusiones:** Cuando se administraron 20 µl de la cepa vacunal Elstree a un título de 10⁷ UFP a sujetos adultos revacunados, 62,87 respondieron clínicamente, de forma similar a los índices de seroconversión de 62,42. Existe una correlación muy alta entre los dos procedimientos (aproximadamente un 88%). Los títulos antivaccinia alcanzan un pico a los 14 días de la vacunación y declinan en aproximadamente un 30% a los 30 días. Se vio que los títulos de los sujetos revacunados eran altamente variables a los 30 días de la vacunación y sólo un 10-15% de los sujetos revacunados tenían títulos por encima de 1.000 unidades arbitrarias, que cumplen con la producción de globulinas para vacunas hiperinmunes. Estos datos sugieren que sería imperativo hacer una prueba de cribado para el sujeto hiperinmune.

Resumen

45 Los estudios preliminares indican que los títulos de inmunoglobulina G de voluntarios revacunados son muy variables, por lo que los productos de VIG que se producen a partir de dicho pool de plasma dan como resultado títulos relativamente bajos. Los estudios indican que es factible utilizar el procedimiento de cribado rápido ELISA, en donde se pueden seleccionar las muestras de plasma antivaccinia de título alto. La producción de un pool de unidades de plasma con título alto que dan cuenta de un 10-15% de la población de donantes para la producción de una inmunoglobulina intravenosa al 10% y la concentración del pool darían lugar a la producción de VIG-TA.

50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una composición concentrada de inmunoglobulinas que tiene un título de anticuerpos igual o superior a 1:60.000.000, según se determina por ELISA, para tratar a sujetos vacunados contra, o infectados con, un microorganismo patógeno, que comprende:
 - 5 **(a)** seleccionar donaciones de sangre o de plasma obtenidas de una población de individuos previamente revacunados contra uno o más antígenos asociados al microorganismo patógeno;
 - (b)** determinar el nivel de anticuerpos específicos inmunorreactivos con dicho microorganismo patógeno mediante un inmunoensayo ELISA en dichas donaciones de sangre o de plasma de dichos individuos para identificar a individuos con título muy alto que tienen un título muy alto de dichos anticuerpos específicos;
 - 10 **(c)** combinar sangre o componentes de la sangre que comprenden inmunoglobulinas sólo de dichos individuos con título muy alto, y
 - (d)** purificar y/o concentrar el producto de la etapa (c), para obtener una composición concentrada de inmunoglobulinas,

en el que dichos individuos con título muy alto son los que dan la mayor respuesta y que constituyen el 10-15% de dicha población revacunada de a), en el que dicho microorganismo patógeno es un virus de la vaccinia.
- 15 2. El procedimiento según la reivindicación 1, que además comprende la etapa de alicuotar la composición concentrada de inmunoglobulinas en una forma de dosificación unitaria de poco volumen que contiene menos de 10 ml.
- 20 3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicha forma de dosificación unitaria de poco volumen comprende un vial o una jeringa precargada.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la composición concentrada de inmunoglobulinas contiene de un 8 a un 12%, o un 10%, de proteína.
- 25 5. Una composición de inmunoglobulina preparada según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el título de anticuerpos específicos de la composición es al menos 10 veces superior al título de anticuerpos específicos de un pool de donaciones de sangre o de plasma no seleccionadas obtenidas de la población de individuos previamente revacunados contra uno o más antígenos asociados al microorganismo patógeno de la etapa a), y en la que el título de anticuerpos de la composición es igual o superior a 1:60.000.000, determinado por ELISA.
- 30 6. La composición de inmunoglobulinas según la reivindicación 5, que tiene menos de un 3% de contenido en agregados proteicos.
7. La composición de inmunoglobulinas según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la que dichos anticuerpos específicos son anticuerpos antivaccinia.
8. La composición de inmunoglobulinas según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende de un 8 a un 12%, o un 10%, de proteína.
- 35 9. Un vial o una jeringa precargada que contiene menos de 10 ml de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.
10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para su uso en el tratamiento o el mejoramiento de los síntomas asociados a una reacción adversa a la vacunación contra un microorganismo patógeno, en la que dicho microorganismo patógeno es un virus de la vaccinia.
- 40 11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, que comprende anticuerpos específicos antivaccinia para su uso en el tratamiento o la prevención de la infección de la viruela.

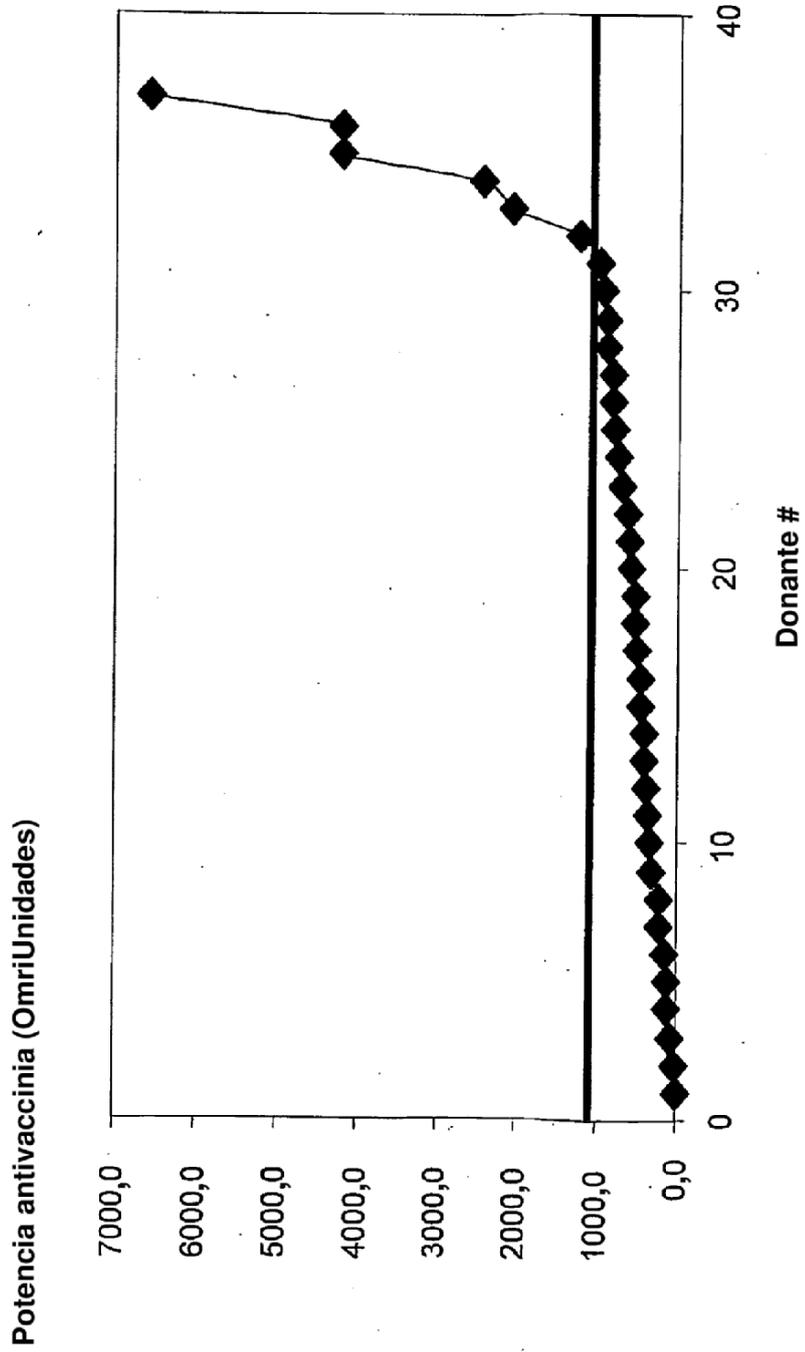


FIG.1

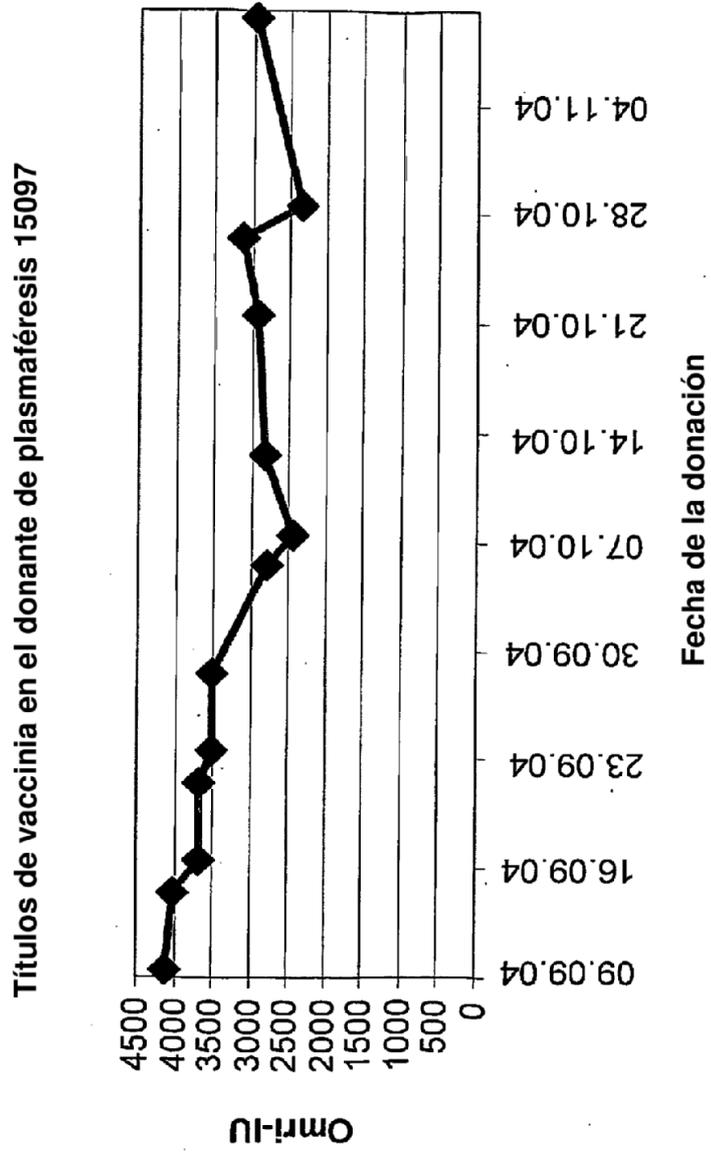
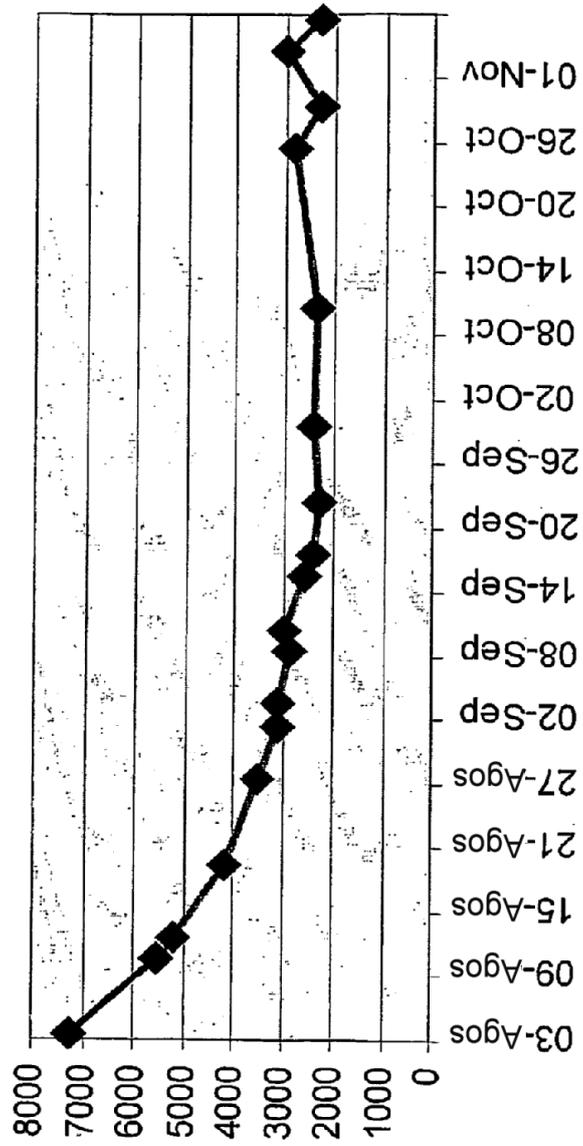


FIG.2

Títulos de vaccinia en el donante de plasmateresis 68893



Fecha de la donación

FIG.3