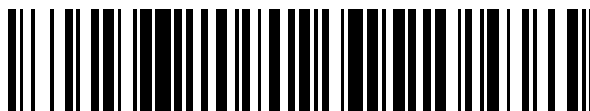


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 540**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2006 E 06847150 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 1968634**

54 Título: **Procedimiento de preparación de concentrado de inmunoglobulinas G (IgG) empobrecido en anticuerpos anti-A y anti-B**

30 Prioridad:

26.12.2005 FR 0513311

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

03.11.2014

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)**

**3, Avenue des Tropiques ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**CHTOUROU, ABDESSATAR;
DHAINAUT, FRÉDÉRIC y
PAOLANTONACCI, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

DÍAZ NUÑEZ, Joaquín

ES 2 517 540 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 de preparación de concentrado de inmunoglobulinas G (IgG) empobrecido en anticuerpos anti-A y anti-B.

5

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un concentrado de IgG.

10

[0002] La utilización de fracciones de plasma humano enriquecidas en inmunoglobulinas (Ig) para el tratamiento de diversas infecciones diversas o déficits congénitos se conoce desde el desarrollo del procedimiento de precipitación etanólica de Cohn (Cohn y col. 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459; Oncley y col. 1949, J. Am. Chem. Soc. 71, 541).

15

[0003] Existe, con este fin, una necesidad creciente de producir concentrados de Ig altamente purificados, inyectables por vía intravenosa (IgIV), a partir, por ejemplo, de plasmas humanos. La complejidad de la estructura de las inmunoglobulinas (cuatro cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro), y la diversidad de anticuerpos presentes en la mezcla plasmática de varios miles de donantes, son factores que actualmente no favorecen el desarrollo biotecnológico de las inmunoglobulinas. Aunque se producen anticuerpos monoclonales por ingeniería genética, su extrema especificidad constituye un inconveniente para las aplicaciones terapéuticas en las que parece necesaria una poliespecificidad.

20

[0004] Además, numerosas patologías, por ejemplo de origen autoinmune, se tratan actualmente con concentrados de IgG, lo que conduce a una situación de escasez en Europa y en Estados Unidos en los últimos años.

25

[0005] Los procedimientos de obtención de inmunoglobulinas, y particularmente de concentrados de IgG, también pueden comprender, además de la precipitación selectiva de las proteínas por etanol, diversos tratamientos diferentes, tales como precipitación por polietilenglicol, tratamiento controlado por enzimas proteolíticas..., destinados a eliminar los agregados de polímeros de inmunoglobulinas susceptibles de activar el sistema del complemento con riesgos asociados de reacciones anafilácticas. Por otro lado, la presencia de dímeros en las IgGIV se ha relacionado con caídas de la tensión arterial *in vivo* (Bleeker W.K. y col., Blood, 95, 2000, pág. 1856-1861).

30

[0006] Una vía alternativa a la precipitación por etanol se ha descrito por Steinbuch y col. (Rev. Franç. Y. Clin. Y Biol. 1969, XIV, 1054) que recurren a la precipitación por ácido octanoico. Este ácido precipita la inmensa mayoría de las proteínas del plasma y deja las inmunoglobulinas en el sobrenadante. La purificación de estas inmunoglobulinas se realiza pasando a través de un intercambiador de aniones, DEAE-celulosa, en condiciones que no retienen las IgG. Después, la fracción de IgG no retenidas se concentra.

35

40

[0007] Se han desarrollado también diversos procedimientos para aumentar la pureza de los productos por la aplicación de técnicas cromatográficas. Podemos citar particularmente las solicitudes de patente EP 0 703 922 y WO 99/64462, que describen la asociación de al menos dos etapas sucesivas de cromatografía, una por intercambio aniónico, la otra por intercambio catiónico. La especificidad de estos procedimientos se proporciona por la propiedad de los intercambiadores aniónicos de no retener las inmunoglobulinas G, en las condiciones de cromatografía convencionales, pero en su lugar fijan la mayor parte de las demás proteínas co-purificadas en el transcurso de las etapas de prepurificación. De forma análoga, se puede citar la solicitud de patente WO 02/092632, presentada por el Solicitante, que divulga la preparación de concentrados de Ig usando una única etapa de cromatografía en intercambiador aniónico, realizada a un pH alcalino, para su retención en el medio cromatográfico.

45

50

[0008] Los documentos MAZID M A Y COL.: "An improved affinity support and immunoabsorbent with a synthetic blood group oligosacárido and polimer coating for hemoperfusion". JOURNAL OF APPLIED BIOMATERIALS: SPRING 1992, vol. 3, Nº 1, abril de 1992 y HOUT M S Y COL.: "Specific removal of anti-A and anti-B antibodies by using modified dialysis filters". ASAIO JOURNAL (AMERICAN SOCIETY FOR ARTIFICIAL INTERNAL ORGANS: 1992) NOV-DIC 2000, vol. 46, Nº 6, noviembre de 2000 (2000-11), páginas 702-706, describen procedimientos que pretenden eliminar los anti-A y anti-B de un paciente antes de un trasplante y no describen de ninguna manera la preparación de un concentrado de IVIG desprovisto de anti-A y de anti-B.

55

[0009] El documento KNEZEVIC-MARAMICA IRINA Y COL.: "Intravenous immune globulins: an update for clinicians". TRANSFUSIÓN. OCT 2003, vol. 43, Nº 10, octubre de 2003 (2003-10), páginas 1460-1480, establece una revisión de las diferentes ventajas, inconvenientes y las indicaciones terapéuticas que caracterizan las IVIG. D4 divulga particularmente que las IVIG distribuidas en el mercado contienen niveles que pueden medirse de anticuerpos anti-A y anti-B y que estos anticuerpos pueden implicar la lisis de los hematíes del receptor.

60

[0010] El documento NICHOLLS M D Y COL.: "HEMOLYSIS INDUCED BY INTRAVENOUSLY-ADMINISTERED IMMUNOGLOBULIN" MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA, vol. 150, Nº 7, 1989, páginas 404-406, aborda la hemólisis inducida por las inmunoglobulinas administradas por vía intravenosa.

65

[0011] El documento WO01/58510 describe un medio de tipo Sepharose 4FF en el que se fijan los trisacáridos correspondientes a los epítomos de los grupos sanguíneos A y B.

5 [0012] Sin embargo, numerosas publicaciones científicas indican que la inyección de IgG obtenidas por las técnicas de fraccionamiento anteriores puede causar una hemólisis accidental, a veces grave, entre los pacientes en tratamiento. En calidad de ejemplo, pueden citarse las publicaciones de Buchta C. y col., *Biologicals*, 33, 2005, 41-48, Wilson J.R. y col., *Muscle & Nervi*, 29 (9), 1997, 1142-1145, Copelan E.A y col., *Transfusion*, 26, 1986, 410-412, y Misbah S.A y col., *Drug Safety*, 9, 1993, 254-262. El estudio de los efectos sobre la sangre de los pacientes que presentaban una hemólisis, realizado particularmente usando la prueba de Coombs directa (DCT), mostró que los hematíes están revestidos de inmunoglobulinas dirigidas contra los antígenos A, B o D presentes en su superficie, provocando así su hemólisis. Por esta razón las IgG disponibles en el mercado se obtienen a partir de plasmas seleccionados para evitar la presencia de inmunoglobulinas anti-D u otros anticuerpos con títulos elevados de anti-A o anti-B.

15 [0013] Buchta C. y col., que se ha citado anteriormente, consideraron diferentes enfoques para reducir de modo significativo los anticuerpos anti-A, que provenían de donantes de grupos sanguíneos B y O, y anti-B, que provenían de donantes de grupos sanguíneos A y O, en los derivados de plasma, tales como las IgG, para minimizar así los riesgos de hemólisis, directamente asociados a los niveles de estos anticuerpos, en el momento del tratamiento de los pacientes con estos derivados plasmáticos. Particularmente, se prevé escoger a los donantes, eliminar los anticuerpos anti-A y anti-B, producir derivados de plasma sanguíneo con origen en un grupo específico, grupo A y/o B, y excluir de los lotes los plasmas que tienen un título elevado de anticuerpos anti-A o anti-B. Algunos enfoques están considerados como no realistas debido al coste o de la complejidad de las etapas que hay que tomar. Se aprecia que los anticuerpos anti-A y anti-B se eliminan parcialmente en el transcurso del fraccionamiento etanólico que se ha mencionado anteriormente.

20 [0014] Dado que las necesidades de IgG están en constante aumento, es necesario disponer de agrupamientos de donantes cada vez mayores que, estadísticamente, incluirán mayor número de donantes del grupo O. En consecuencia, los derivados sanguíneos, tales como las IgG, contendrán cantidades de anticuerpos anti-A y anti-B demasiado elevadas para eliminarse por fraccionamiento convencional.

25 [0015] Estas necesidades crecientes no hacen tampoco factible seleccionar, por ejemplo, únicamente los donantes de grupo AB, para asegurarse un bajo contenido en anticuerpos anti-A y anti-B.

30 [0016] Cada lote de concentrados o preparaciones de IgG purificadas se controla frente a anticuerpos anti-A y anti-B según la prueba de la Farmacopea Europea 2.6.20 (1997), que es una aplicación *in vitro* de la prueba de Coombs indirecta (ICT). El ensayo ICT consiste en añadir a una suspensión de hematíes, revestidos con anticuerpos anti-A o anti-B de tipo IgG contenidos en los concentrados de IgG, una solución de anticuerpos (antiglobulinas) dirigida contra motivos de las IgG humanas. Estos anticuerpos se unen a anticuerpos anti-A o anti-B fijados a los hematíes y causan así su aglutinación a través de la formación de puentes entre las IgG. El ensayo para la detección de anticuerpos anti-A o anti-B se inspira directamente por esta prueba convencional en la serología hematológica (prueba de Coombs).

35 [0017] Según la Farmacopea Europea, las IgIV no deben presentar ninguna aglutinación de los glóbulos rojos A o B en la prueba ICT en una dilución 1:64, realizada con una solución de IgG cuya concentración inicial se reduce a 30 g/l.

40 [0018] Por esta razón, conviene diluir las muestras de IgG que se van a ensayar para obtener un título, es decir, el valor de la última dilución que ya no cause aglutinación. Los resultados negativos a la prueba ICT en las soluciones de IgIV cuyas diluciones son inferiores a la dilución 1:64, según la Farmacopea Europea, demuestran un bajo contenido de anticuerpos anti-A y anti-B que sea aceptable. No obstante, incluso con concentrados de IgG que dan un resultado negativo a la prueba prescrita por la Farmacopea Europea, es decir aquellos cuyo relación de dilución sea inferior a 1:64, el riesgo de reacciones hemolíticas no puede excluirse (Buchta y col., citado anteriormente).

45 [0019] Se apreciará que las Farmacopeas Americana y Japonesa no contemplan la necesidad de controlar el contenido residual de anticuerpos anti-A y anti-B.

50 [0020] Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos anti-A y anti-B se eliminan parcialmente durante la preparación de concentrados de IgG por fraccionamiento etanólico, pero se observa un contenido residual que puede exceder el límite superior de la Farmacopea Europea. Además, los concentrados preparados según el procedimiento desarrollado por el Solicitante y descrito en su solicitud de patente WO 02/092632, tienen un mayor contenido de los mismos que los obtenidos por fraccionamiento etanólica. Por lo tanto, es necesaria una purificación adicional de los concentrados de IgG obtenidos de este modo con respecto a AcaA y AcaB, puesto que algunos lotes de concentrados de IgG pueden presentar contenidos superiores al umbral establecido por la Farmacopea Europea para cada uno de ellos.

55 [0021] Una de las técnicas para eliminarlos de los concentrados de IgG consiste en la purificación por cromatografía de afinidad usando inmunoabsorbentes como medio, de tipo oligosacáridos similares a los antígenos A y B de los grupos sanguíneos, siendo dichos oligosacáridos particularmente trisacáridos injertados en una matriz cromatográfica.

- 5 **[0022]** En calidad de ejemplo, se puede hacer mención a la publicación de Mazid M.A y col., J.Appl. Biomater., 3 (1), 1992, 9-15, que utiliza un medio cromatográfico a base de partículas de sílice sobre las que se injertan haptenos de oligosacáridos sintetizados, característicos de los grupos sanguíneos A y B, en particular A-trisacáridos. Además, Hout M.S y col. (ASAIO J, 46 (6), 2000, 702-706) describen el uso de membranas fibrosas tubulares injertadas con antígenos específicos anti-A y anti-B para la eliminación de los anticuerpos anti-A y anti-B de la sangre completa. También se informa de que dichos medios cromatográficos son muy estables, lo que limita la liberación de estos haptenos residuales en los concentrados de interés.
- 10 **[0023]** La solicitud de patente WO 01/27623 describe un procedimiento de obtención de un plasma no desespecificado en anticuerpos de grupos sanguíneos A y B, es decir un plasma adecuado para cualquier receptor. Estas especificidades se llevan básicamente por las inmunoglobulinas M (IgM). La desespecificación se obtiene pasando a través de un medio de afinidad experimental para el grupo A, después a través de otro medio de afinidad, también experimental, para el grupo B. En caso de presencia simultánea de anti-A y anti-B (grupo O), es necesario el paso sucesivo a través de ambos medios.
- 15 **[0024]** Una de las características adicionales de los concentrados de IgG disponibles en el mercado es su polireactividad. Conviene recordar que los anticuerpos policlonales, tales como las IgG, se combinan normalmente con un único epítipo (motivo antigénico) de modo único. Sin embargo, esta especificidad estricta de los anticuerpos puede extenderse a veces a otros motivos antigénicos y presentar una afinidad para epítipos secundarios, con un enlace no obstante más débil que para el motivo nominal. Las IgG policlonales pueden reaccionar en mayor o menor medida con estructuras tales como actina, miosina, albúmina modificada por trinitrofenilo.
- 20 **[0025]** A este respecto, las inmunoglobulinas intravenosas (IgIV) son preparaciones de IgG humanas policlonales que contienen:
- 25 - Anticuerpos inmunes dirigidos contra antígenos externos y que resultan de un proceso de inmunización,
 - Anticuerpos naturales que reconocen proteínas intracelulares, antígenos de membrana superficial, proteínas auto-circulantes y la región variable de otros anticuerpos. Los últimos se denominan anticuerpos anti-idiotípicos (Kazatchkine M.D. y col., Immunol. Rev., 139, 1994, 79-107).
- 30 **[0026]** Los anticuerpos naturales no se obtienen de una inmunización deliberada (Coutinho A. y col., Curr. Opin. Immunol., 7, 1995, 812-818. Son polireactivos en el sentido que expresan afinidades variables para los auto-antígenos (Berneman A. y col., Eur. J. Immunol., 22, 1992, 625-631 y Lacroix-Desmazes y col., J. Immunol. Methods, 216, 1988, 117-137).
- 35 **[0027]** Los tratamientos químicos (urea 6 M, tiocianato sódico 1,3 M y tratamiento ácido pH = 2,0) de las IgIV pueden aumentar la actividad polireactiva de estas inmunoglobulinas policlonales (Bouvet J.P. y col., J. Autoimmun. 16 (2), 2001, 163-172). Sin embargo, jamás se ha demostrado ningún efecto beneficioso en pacientes tratados con dichas inmunoglobulinas.
- 40 **[0028]** En resumen, la actividad polireactiva de los anticuerpos presentes en una preparación de IgIV puede deberse a:
- 45 - La presencia de anticuerpos naturales contenidos en cada plasma individual,
 - La presencia de anticuerpo anti-idiotípicos contenidos en cada plasma individual,
 - La polireactividad de los anticuerpos generada por el procedimiento de producción.
- 50 **[0029]** Por lo tanto, algunos autores consideran que la polireactividad es una propiedad intrínseca de las IgG que están, por lo tanto, presentes de forma natural en el organismo humano.
- 55 **[0030]** Otros demuestran que un procedimiento de purificación de las IgG monoclonales o policlonales puede poner de manifiesto una polireactividad imperceptible antes de la purificación. De hecho, los procedimientos para producir IgG a partir del plasma también generan una polireactividad que se traduce en un "estrés" oxidativo y la carbonilación parcial de las IgG durante la producción.
- 60 **[0031]** Esto se confirma por Bouvet J.-P. y col., Journal of Autoimmunity, 16, 2001, págs.163-172, para los que las IgG policlonales se vuelven altamente polireactivas después de un tratamiento con urea particularmente. Se indica también en este documento que una parte de la eficacia de las IgG en su uso clínico se atribuye a su polireactividad.
- 65 **[0032]** Se vuelve a resaltar que la polireactividad de estos concentrados de IgG puede explicarse, por lo tanto, por la presencia conjunta de IgG polireactivas naturales y de IgG polireactivas obtenidas por los procedimientos convencionales de purificación, y representan, según los casos, del 0,5 al 1% del conjunto de las IgG polivalentes. El tratamiento de pacientes con preparaciones de IgG puede necesitar la administración de dosis elevadas, de hasta 1 a 2 g/por kg. Estas dosificaciones conducen a un tratamiento a corto plazo, por ejemplo, en un día, con cantidades 7 a 10 veces superiores a las cantidades de IgG fisiológicas del receptor. Por consiguiente, este nivel de IgG

polireactivas generadas por el procedimiento de producción en los concentrados de IgG es susceptible de causar efectos secundarios no deseados, tales como fiebre, náuseas o cefalea.

5 **[0033]** Por lo tanto, conviene hacer una distinción entre la polireactividad de los anticuerpos debido a anticuerpos naturales y anti-idiotípicos, que, como se muestra por el Solicitante en su solicitud de patente EP 1 059 088, presenta ventajas, de la polireactividad de los anticuerpos generada por el procedimiento de producción. En efecto, el Solicitante ha mostrado en su solicitud de patente EP 1 059 088 que las fracciones de IgG polireactivas contenidas de forma natural en el plasma, aisladas de las IgGIV polivalentes humanas, pueden usarse ventajosamente para el tratamiento de ciertas enfermedades inflamatorias, tales como poliartritis reumatoide, debido a una menor dosificación requerida para esta fracción.

15 **[0034]** Por lo tanto, para evitar reacciones indeseables tanto en el plano de la hemólisis de los hematíes como en el plano de las reacciones secundarias susceptibles de producirse por la administración masiva de IgG durante el transcurso de un tratamiento, resulta necesario disponer de concentrados de IgG para su uso terapéutico, en particular para inyección intravenosa, empobrecidos de manera significativa en anticuerpos anti-A y anti-B y cuya polireactividad generada por el procedimiento de producción sea preferentemente muy reducida en comparación con los concentrados de IgG actualmente disponibles en el mercado, teniendo al mismo tiempo una eficacia al menos idéntica con respecto a la inmunoterapia.

20 **[0035]** La invención se refiere a un procedimiento de producción de inmunoglobulinas G que permiten no generar estos anticuerpos polireactivos que pueden ser peor tolerados que los anticuerpos naturales y anti-idiotípicos. Debido a ello, las IgIV obtenidas por el procedimiento tienen una polireactividad inferior que otras IgIV estudiadas.

25 **[0036]** En el marco de la invención, las IgG de estos concentrados son ventajosamente IgG policlonales obtenidas a partir del plasma sanguíneo o de una fracción de plasma sanguíneo ya enriquecida con IgG. Los concentrados de IgG de uso terapéutico tienen concentraciones en IgG comúnmente aplicadas actualmente, comprendidas preferentemente entre 50 y 100 g/l. Estos concentrados están destinados a un uso clínico y pueden inyectarse, en particular, por vía intravenosa. Para este fin, deben ser viralmente seguros, y opcionalmente pueden contener excipientes, tales como estabilizantes compatibles con este uso clínico.

30 **[0037]** El Solicitante ha descubierto que es posible proporcionar dichos concentrados de IgG que tienen un contenido de anticuerpos anti-A y anti-B netamente inferior que el observado en los concentrados de IgG convencionales, es decir, los obtenidos por fraccionamiento etanólico y/o por la aplicación de las técnicas de purificación que se asocian a cromatografías, como se ha mencionado anteriormente, y que no son objeto de un tratamiento adicional para eliminar los anticuerpos considerados. Igualmente, sus contenidos son netamente inferiores a los umbrales aceptados por la Farmacopea Europea, lo que limita muy significativamente los riesgos de hemólisis entre ciertos receptores en tratamiento. Cuando los concentrados de IgG de la invención se someten a ensayos destinados a evaluar las cantidades de AcaA y AcaB, se observa que los resultados de los ensayos de aglutinación *in vitro* de los glóbulos rojos A, B y/o AB en presencia de anticuerpos anti-IgG humanas son sistemáticamente negativos, particularmente en la concentración inicial de 30 g/l impuesta por el procedimiento de la Farmacopea Europea. La aplicación de la prueba de Coombs indirecta, que se ha definido anteriormente, con concentrados de IgG de la invención conduce, por lo tanto, a resultados sistemáticamente negativos, incluso con muestras de IgG tal cuales, es decir, no diluidas. Resulta pues, que el contenido en estos anticuerpos anti-A y anti-B en estos concentrados ya no es detectable por la prueba ICT.

45 **[0038]** Cuando el nivel de anticuerpos anti-A y anti-B es muy bajo en los concentrados de IgG, la prueba ICT ya no puede aplicarse, con más razón en las condiciones de la Farmacopea Europea, dado que las reacciones de aglutinación de los hematíes ya no tienen lugar, incluso con la adición de anticuerpos anti-IgG humanas, ya que la densidad de los anticuerpos anti-A y anti-B es demasiado débil para el establecimiento de puentes entre los hematíes por la unión de los anticuerpos anti-A y anti-B fijados a los hematíes humanos y los anticuerpos anti-IgG humanas.

50 **[0039]** Sin embargo, es posible verificar la presencia de estos anticuerpos anti-A y/o anti-B con una concentración muy baja provocando la inmunohemólisis de los glóbulos rojos que fijan estos anticuerpos y midiendo un empobrecimiento con relación a un concentrado convencional que no ha sufrido un tratamiento de eliminación de AcaA y/o AcaB. La inmunohemólisis es una reacción inmunológica específica que se produce cuando el anticuerpo está ligado a su diana en presencia de factores de complemento. La activación del sistema del complemento conduce a la liberación de perforinas que perforan la membrana del glóbulo rojo, dejando salir a la hemoglobina. Basta entonces con medir por un procedimiento sensible, por ejemplo por medio de trazadores radiactivos (véase a continuación), la cantidad de hemoglobina liberada, proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-A y/o anti-B presentes.

60 **[0040]** El Solicitante ha demostrado que el concentrado de IgG comprende un contenido en anticuerpos anti-A no superior a 23 ng/mg de IgG, en particular entre 19 y 23 ng/mg de IgG, y un contenido en anticuerpos anti-B no superior a 20 ng/mg de IgG, en particular entre 12 y 20 ng/mg de IgG.

- 5 [0041] Ventajosamente, el Solicitante ha descubierto que también es posible proporcionar dichos concentrados de IgG con un contenido muy bajo en IgG polireactivas, particularmente las generadas por el procedimiento de producción, confiriéndoles así un carácter casi no polireactivo, siendo tan eficaces en el tratamiento de las inmunoterapias como los concentrados de IgG de la técnica anterior. Esta ausencia notable del carácter de polireactividad de las IgG debido al procedimiento de producción reduce sustancialmente los riesgos de efectos secundarios susceptibles de producirse como consecuencia de los tratamientos que necesitan altas dosis.
- 10 [0042] Es también ventajosamente posible corregir los efectos adversos ligados a la presencia de IgG polireactivas en el concentrado de IgG debidos al procedimiento de producción, generada esta presencia particularmente por el "estrés" oxidativo y la carbonilación durante los procedimientos de purificación.
- 15 [0043] Preferentemente, el contenido residual de IgG polireactivas está comprendido entre el 0,01% y el 0,1%, en particular entre 0,07 y el 0,1%. En el marco de la invención, por contenido de IgG polireactivas se refiere a un porcentaje molar o en peso. Este contenido se determina usando los procedimientos descritos por el Solicitante en la solicitud de patente 1 059 088.
- 20 [0044] Por lo tanto, los concentrados de IgG se definen por una ausencia notable de anticuerpos anti-A y anti-B en los principios activos, que se dirigen contra los epítomos presentes en los glóbulos rojos.
- 25 [0045] Los concentrados de IgG pueden presentarse en forma líquida o liofilizada, en presencia de estabilizantes apropiados, y pueden almacenarse a la espera de una utilización posterior. Estos estabilizantes representan ventajosamente a los elaborados por el Solicitante en su solicitud de patente WO 2004/091656 A2, a saber, una mezcla de un azúcar alcohólico, preferentemente manitol, sorbitol o sus isómeros, de glicina y de un detergente no iónico, tal como Tween® 80, Tween® 20, Triton® X100 o Pluronic® F68, siendo los tres compuestos farmacéuticamente aceptables.
- 30 [0046] Las concentraciones de la formulación se determinaron por el Solicitante para estabilizar las formas líquidas y/o liofilizadas.
- 35 [0047] Preferentemente, las concentraciones finales de manitol en los concentrados están comprendidas entre 30 g/l y 50 g/l, las del detergente, entre 20 y 50 ppm, y las de glicina, entre 7 g/l y 10 g/l. Las concentraciones de estos compuestos representan las concentraciones finales en los concentrados de IgG.
- 40 [0048] Dichos concentrados de IgG, de uso terapéutico, pueden inyectarse en particular por vía intravenosa, como se ha indicado anteriormente. Con este fin, los concentrados de IgG según la invención, deben ser viralmente seguros, por ejemplo, usando un tratamiento convencional de disolvente-detergente conocido en la técnica anterior, por ejemplo, usando una mezcla de Tween® 80/TnBP o Triton® X100/TnBP, y/o etapas de filtración para eliminar eventualmente los virus y/o otras macromoléculas que no se hayan eliminados por el tratamiento viricida de disolvente-detergente, por ejemplo el príon, el agente responsable de la encefalopatía esponjiforme transmisible.
- 45 [0049] La invención se refiere a un procedimiento de obtención de un concentrado de IgG, tal como se ha mencionado anteriormente, que comprende las etapas siguientes de:
- 50 A) Preparación de un concentrado de IgG por fraccionamiento etanólico y/o por separación cromatográfica, asociando una etapa de inactivación vírica,
 B) Cromatografía de inmunoafinidad por percolación de dicho concentrado de IgG en una mezcla de medios de soporte cuyas matrices se injertan con los grupos N-acetilgalactosamina (GalNAc)-Galactosa (Gal)-Fucosa (Fuc) y Galactosa-Galactosa-Fucosa correspondientes a los epítomos de los grupos sanguíneos A y B, y
 C) Filtración para eliminar los virus y/o de partículas de tamaño superior a 20 nm.
- 55 [0050] El Solicitante ha descubierto de manera sorprendente que no sólo dicho procedimiento puede implementarse muy ventajosamente a escala industrial, sino que la combinación de las etapas que conducen a la preparación de concentrados de IgG y de una etapa específica de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B permite obtener un concentrado de IgG según la invención, de uso terapéutico, que comprende además, preferentemente, un índice de IgG polireactivas inferior al 0,1% con relación al contenido total en IgG. Adicionalmente, dicho concentrado comprende un índice en AcaA y AcaB no deseados muy inferior al valor límite en base al ensayo descrito en la Farmacopea Europea, e incluso dando un resultado negativo por la aplicación de la prueba ICT en dichas muestras no diluidas.
- 60 [0051] Preferentemente, la etapa a) del procedimiento puede ser en sí misma un procedimiento de obtención de concentrados de IgG, tales como los que se han mencionado anteriormente. Se trata de un fraccionamiento etanólico desarrollado por Cohn y col., o bien de una separación cromatográfica, como la descrita, por ejemplo, en los documentos EP 0 703 922 y WO 99/64462. Se da preferencia particular a los procedimientos desarrollados por el Solicitante en las solicitudes de patente WO 94/29334 y WO 02/092632 A1, y más particularmente al descrito en el documento WO 02/092632 A1. En este caso, la etapa a) del procedimiento de la invención comprende una
- 65

purificación previa por precipitación de contaminantes lipídicos a partir de un plasma sanguíneo o de una fracción de plasma sanguíneo enriquecida con IgG, una cromatografía sencilla sobre un soporte de resina de intercambio aniónico realizada a pH alcalino, una elución selectiva de las IgG en una etapa usando un tampón adecuado a un pH comprendido entre 4 y 7.

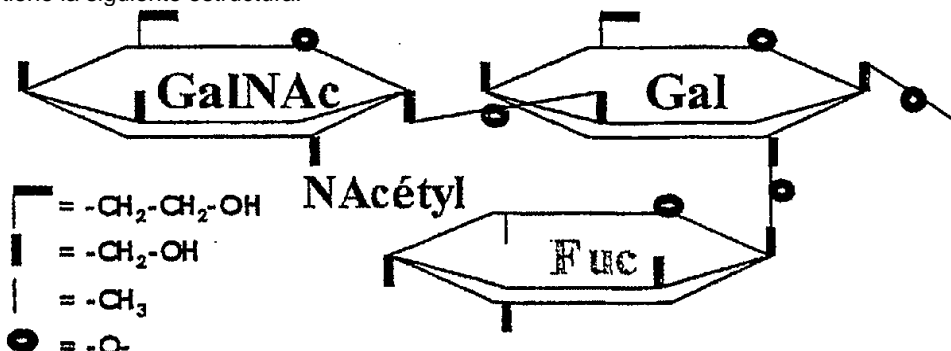
5 [0052] La etapa a) del procedimiento comprende un tratamiento de inactivación vírica, preferentemente usando un disolvente-detergente, como se describe por Horowitz en la patente de Estados Unidos 4 764 369. Se realizará juiciosamente antes de una, o cuando sea aplicable, antes de la etapa cromatográfica posterior realizada para eliminar particularmente los residuos químicos de este tratamiento.

10 [0053] La fracción de IgG recogida está ya lo suficientemente concentrada, y después puede experimentar etapas de concentración adicionales por ultrafiltración y filtración de esterilización.

15 [0054] Después, este concentrado se somete a una etapa cromatográfica de inmunoafinidad sobre una mezcla de dos medios de soporte injertados con los grupos N-acetilgalactosamina (GalNAc) - Galactosa (Gal) - Fucosa (Fuc) y Galactosa-Galactosa-Fucosa, correspondientes a los epítomos de los grupos sanguíneos A y B, preferentemente sobre una columna cargada con dicha mezcla de medios.

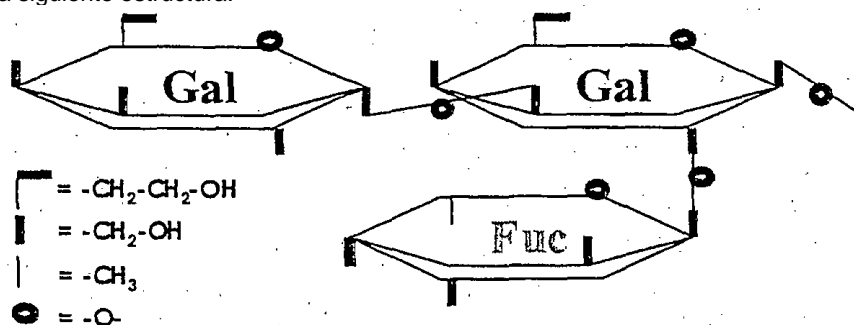
20 [0055] Preferentemente, el soporte cromatográfico consiste en una matriz de polímero reticulado natural, de tipo agarosa, en la que se injertan separadores o brazos de acoplamiento que, a su vez, se injertan con dichos trisacáridos correspondientes a los epítomos de los grupos sanguíneos A y B. En particular, se obtienen muy buenos resultados aplicando un soporte cuyos trisacáridos, correspondientes al epítomo del grupo sanguíneo A, presentan la estructura N-acetilgalactosamina (GalNAc) - Galactosa (Gal) - Fucosa (Fuc), y los correspondientes al epítomo del grupo sanguíneo B presentan la estructura Galactosa-Galactosa-Fucosa. Dicho soporte representa muy ventajosamente un gel o una resina disponible en el mercado con el nombre comercial GLYCOSORB ABO®, de Glycorex Transplantation AS (Suecia).

25 [0056] En calidad de ejemplo, si se utiliza este soporte, el trisacárido correspondiente al epítomo del grupo sanguíneo A tiene la siguiente estructura:



30 N-acetilgalactosamina (GalNAc)
Galactosa (Gal)
Fucosa (Fuc).

35 [0057] En calidad de ejemplo, si se utiliza este soporte, el trisacárido correspondiente al epítomo del grupo sanguíneo B tiene la siguiente estructura:



40 [0058] Ventajosamente, la mezcla de soportes injertados con grupos de antígenos similares al grupo sanguíneo A y grupo sanguíneo B tiene una proporción respectiva comprendida entre 25/75 y 75/25 (v/v). Es posible en efecto, ajustar la proporción de ambos soportes en la columna a la población de los donantes según la distribución de sus grupos sanguíneos. En el marco de una utilización habitual, la columna se carga preferentemente con una mezcla

50/50 (v/v) de cada soporte específico que se ha mencionado anteriormente. Pueden usarse columnas de análisis de 15 a 25 cm de longitud y de 0,5 a 1 cm de diámetro. En el caso de una aplicación a escala piloto, pueden usarse columnas de 40 a 60 cm de longitud y de 40 a 60 mm de diámetro. En este caso, es posible cargar la columna con 600 ml de medio de inmunoafinidad.

5 **[0059]** Dicho soporte se almacena en NaOH 1 M entre dos ciclos de uso. Antes del uso, se lava con agua.

10 **[0060]** Después, la columna de cromatografía por inmunoafinidad se carga con el concentrado de IgG, preferentemente en una proporción de 0,2 a 4 litros, en particular de 1 a 2 litros, por mililitro de medio. La especificidad de dicho medio no necesita un rellenado previo de la fracción de IgG, es decir, es adecuado cualquier fracción o concentrado de IgG obtenido por técnicas de fraccionamiento de plasma de la técnica anterior.

15 **[0061]** La percolación del concentrado no hace intervenir el mecanismo de elución. Por consiguiente, cualquiera que sea la manera en la que se obtiene el concentrado de IgG, se somete a percolación a través de la columna, opcionalmente usando una bomba. Esta percolación permite la retención de los AcaA y AcaB y las IgG polireactivas. Ventajosamente, después, la columna se lava con agua para recoger las IgG aún presentes en el volumen muerto de la columna.

20 **[0062]** Después de la percolación del concentrado de IgG, se obtiene una fracción de IgG empobrecida en AcaA y AcaB, así como en IgG polireactivas obtenidas a partir del procedimiento de producción. En efecto, los AcaA y AcaB se retienen por su motivo antigénico del soporte cromatográfico que modifica su configuración. Por consiguiente, las IgG polireactivas generadas durante el procedimiento de producción se retienen también en los sitios expuestos por este cambio de configuración. La afinidad de estas IgG polireactivas retenidas de modo secundario es mucho menos importante que la de AcaA y AcaB. Es posible su elución por fraccionamiento, después del paso de las IgG, a través del uso de un tampón de elución que contiene, por ejemplo, una sal de metal alcalinotérreo que tiene una concentración comprendida entre 0,1 y 1,5 M, con un pH de 3-8, 6.

25 **[0063]** Después de la etapa b), procedimiento puede comprender etapas de concentración por ultrafiltración y filtración por esterilización.

30 **[0064]** Después, la columna cromatográfica y el soporte se lavan con una solución de ácido, por ejemplo de Glicina-HCl, pH 2,8, para la desorción de los AcaA y AcaB retenidos en el medio. Después, este medio se aclara con agua y se trata con una solución 1 M de NaOH.

35 **[0065]** Después, el concentrado de IgG muy empobrecido en AcaA, AcaB e IgG polireactivas se somete a una filtración de eliminación de virus resistentes al tratamiento por disolvente-detergente y/o para eliminar otras partículas de tamaño superior a 20 nm, tales como priones, los polímeros de IgG generados durante las etapas de producción, los lipopolisacáridos micelares, ácidos nucleicos y proteínas agregadas. Dicho tratamiento representa ventajosamente una nanofiltración, aplicada con filtros de porosidad decreciente de 100 a 15 nm, en particular tres filtros dispuestos en serie y con umbrales de retención decrecientes, de 100, 50 y 20 nm.

40 **[0066]** Después de la etapa c), el procedimiento puede comprender una etapa adicional de adición de estabilizantes con el fin, en primer lugar, de asegurar la estabilidad de los concentrados de IgG durante su almacenamiento, y en segundo lugar, para permitir una liofilización que evite la desnaturalización de las IgG en las diversas fases asociadas a ésta. Preferentemente, se añade una única formulación estabilizante, que es farmacéuticamente aceptable, que cumple el objetivo de asegurar la estabilización de ambas formas de conservación contempladas de las IgG, es decir, en forma líquida o liofilizada, y de conservar, incluso mejorar, la eficacia terapéutica de estas IgG, como se describe en la solicitud de patente WO 2004/091656 A2.

45 **[0067]** Según otras realizaciones, también es posible recuperar selectivamente otras inmunoglobulinas, como se describe en la solicitud de patente WO 02/092632 A1.

50 **[0068]** Los concentrados de IgG se someten opcionalmente a una etapa posterior de concentración por ultrafiltración seguida de una filtración por esterilización, y pueden almacenarse en frascos preferentemente a temperaturas próximas de 4 °C.

55 **[0069]** Como se ha explicado ampliamente anteriormente, los concentrados de IgG comprenden contenidos en AcaA y AcaB muy inferiores a los umbrales admitidos por la Farmacopea Europea. Por consiguiente, el procedimiento de ensayo 2.6.20 (1997) que se indica, puede revelarse insuficientemente sensible para detectar los anticuerpos considerados presentes en muy bajos niveles en los concentrados de IgG. Por lo tanto, es esencial desarrollar procedimientos de ensayo para estos anticuerpos que requieren un umbral de detección inferior que el de la prueba ICP de la Farmacopea Europea aplicada a la detección de AcaA y AcaB.

60 **[0070]** Dicho procedimiento de ensayo para los anticuerpos anti-A y/o anti-B en los concentrados de IgG comprende las etapas que consisten en:

65

- 5 A) Preparar y calibrar una suspensión de hematíes del grupo sanguíneo A, B y/o O Rhesus+,
 B) Preparar soluciones de anticuerpos anti-D monoclonales en un intervalo de concentraciones de 0 a 200 ng/ml en un tampón biológicamente aceptable,
 C) Poner en contacto los dichos hematíes con muestras de soluciones de IgG o con las soluciones de anticuerpos anti-D monoclonales, e incubar las mezclas de hematíes obtenidas de este modo durante un tiempo predeterminado,
 D) Añadir en cada mezcla de hematíes un fragmento de anticuerpos anti-IgG humanos F(ab')₂ marcado con un fluorocromo e incubar dichos hematíes,
 E) Someter cada mezcla de hematíes obtenida en la etapa d) a citometría de flujo,
 10 F) Determinar el contenido en anticuerpos anti-A y/o anti-B en los concentrados de IgG.

15 **[0071]** Una realización de dicho procedimiento para determinar el contenido en anticuerpos anti-A y/o anti-B puede comprender la preparación de una suspensión al 1% (v/v) de hematíes del grupo sanguíneo A, B y/o O en un tampón PBS, de pH comprendido entre 7,0 y 7,4, que contiene del 0,8 al 1,5% en peso de albúmina sérica bovina BSA. Los hematíes de la suspensión se cuentan en un dispositivo de citometría de flujo habitual, cuyo funcionamiento se conoce por el experto en la técnica, y después la suspensión se calibra de 37 a $43 \cdot 10^6$ hematíes/ml de suspensión.

20 **[0072]** Se preparan soluciones de anticuerpos anti-D monoclonales, cuyas concentraciones varían de 0 a 200 ng/ml de tampón, preferentemente un tampón PBS de pH comprendido entre 7,0 y 7,4, que contiene opcionalmente del 0,8 al 1,5% en peso de albúmina sérica bovina BSA. Cada solución preparada de este modo se ensaya por absorciometría con el fin de determinar su coeficiente de extinción molar (ϵ).

25 **[0073]** Después, los concentrados de IgG se ajustan a una concentración comprendida en el intervalo de valores de 1 a 5 mg/ml, preferentemente 1 mg/ml, por medio de un tampón PBS, de pH comprendido entre 7,0 y 7,4, que contiene del 0,8 al 1,5% en peso de albúmina sérica bovina BSA.

30 **[0074]** Se pone un volumen de 50 a 100 μ l de la suspensión de hematíes de cada grupo sanguíneo en cada pocillo de una microplaca, por ejemplo, una microplaca de 96 pocillos, seguido de 50 a 100 μ l de una solución de IgG en esta suspensión de hematíes, o de 50 a 100 μ l de soluciones de anticuerpos anti-D en esta suspensión de hematíes.

[0075] El conjunto se deja incubar durante un tiempo comprendido entre 1 h 30 y 2 h 30, en particular 2 horas, a temperaturas habitualmente comprendidas entre 30 °C y 40 °C, preferentemente a 37 °C.

35 **[0076]** Después, las diferentes mezclas de hematíes obtenidas de este modo se lavan preferentemente con el tampón PBS que contiene la BSA anterior y se centrifugan; después, a cada mezcla de hematíes contenida en una microplaca de pocillos, se le añaden de 50 a 100 μ l de anticuerpos F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana marcados con un fluorocromo, por ejemplo ficoeritrina, presentes en el tampón PBS y la BSA que se ha definido anteriormente.

40 **[0077]** El conjunto se deja incubar durante aproximadamente 20-30 min en la oscuridad.

[0078] Después, las diferentes mezclas de hematíes obtenidas de este modo se lavan y se someten a citometría de flujo usando cualquier aparato adecuado disponible en el mercado que contenga un dispositivo de detección de fluorescencia de los compuestos analizados.

45 **[0079]** La intensidad media de fluorescencia (IMF) se produce con arreglo a la concentración en anticuerpos anti-D monoclonales, y la ecuación de regresión lineal se obtiene por medio del software Excel. Después, para cada muestra, la concentración en anticuerpos anti-D equivalente se obtiene usando la ecuación de regresión lineal. Puesto que se ensayaron lotes triples de las muestras, se determina la concentración media y el coeficiente de variación se calcula usando el software Excel.

50 **[0080]** El contenido en anticuerpos anti-A y anti-B en los concentrados de IgG de la invención puede deducirse a partir de esto, que es ventajosamente el contenido dado anteriormente.

55 **[0081]** Preferentemente, se realiza un procedimiento de ensayo para los AcaA y AcaB en los concentrados de IgG anteriores por citometría de flujo adaptada al contexto de la invención, cuyo principio reside en el uso de hematíes humanos del grupo sanguíneo A o B, según la determinación específica del contenido de AcaA y AcaB deseado, usando detección de una señal de fluorescencia proporcional al contenido de estos anticuerpos.

60 **[0082]** Dicho procedimiento de ensayo comprende las etapas que consisten en:

- A) Preparar y calibrar una suspensión de hematíes del grupo sanguíneo A o B,
 B) Poner en contacto dichos hematíes con muestras diluidas de soluciones de IgG, e incubar la mezcla obtenida de este modo durante un tiempo predeterminado,
 65 C) Incubar dichos hematíes en presencia de un anticuerpo anti-IgG marcado con un fluorocromo, y

D) Someter la suspensión de hematíes obtenida en la etapa c) a citometría de flujo.

[0083] Se prepara una suspensión al 1% (v/v) de hematíes del grupo sanguíneo A o B en un tampón PBS, de pH comprendido entre 7,0 y 7,4, que contiene del 0,8 al 1,5% en peso de albúmina sérica bovina BSA. Los hematíes de la suspensión se cuentan en un dispositivo de citometría de flujo habitual, cuyo funcionamiento se conoce por los expertos en la técnica, y la suspensión se calibra de 37 a $43 \cdot 10^6$ hematíes/ml de suspensión.

[0084] Se pone un volumen de 50 a 100 μ l de suspensión en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos seguido de 50 a 100 μ l de diferentes soluciones de IgG diluidas de dos en dos de una solución de 30 g/l hasta obtener una solución de IgG de 0,234 g/l.

[0085] El conjunto se deja incubar durante entre 1 h 30 y 2 h 30, en particular 2 horas, a una temperatura que varía habitualmente de 30 °C y 40 °C, preferentemente a 37 °C.

[0086] Después, los hematíes se lavan con el tampón PBS que contiene la BSA anterior, se centrifugan, después a cada pocillo se le añaden 50 a 100 μ l de anticuerpos $F(ab)_2$ de cabra anti-IgG humana marcados con fluorocromo, tal como, por ejemplo, ficoeritrina.

[0087] El conjunto (etapa c)) se incuba durante aproximadamente 20-30 min en la oscuridad.

[0088] Después, la suspensión obtenida de este modo se lava y se somete a citometría de flujo usando cualquier aparato adecuado disponible en el mercado que contenga un dispositivo de detección de fluorescencia de los compuestos analizados.

[0089] En calidad de ejemplo, el contenido en anticuerpos anti-A y B de tres concentrados de IgG denominados B1, B2 y B3, preparados respectivamente por fraccionamiento etanólico según el procedimiento de Cohn (citado anteriormente) (B1), según la solicitud de patente WO 02/092632 (B2) y según la solicitud de patente WO 02/092632 seguido por una cromatografía de inmunoafinidad (B3) para el empobrecimiento en anticuerpos anti-A y anti-B, se presentan en la Tabla 1 que se indica a continuación. Los resultados se presentan con respecto al título de control de los anticuerpos anti-A y anti-B en la muestra B1 cuyo contenido de estos anticuerpos se ha fijado arbitrariamente en 1, en calidad de referencia.

Tabla 1

Muestras	Título de anticuerpos anti-A	Título de anticuerpos anti-B
B1	1	1
B2	3,65	3,85
B3	0,68	0,52

[0090] Los resultados de esta tabla muestran en primer lugar que el contenido en anticuerpos anti-A y anti-B de los concentrados de IgG (B1), preparados según el procedimiento de Cohn, contiene aproximadamente cuatro veces menos de los mismos que los concentrados de IgG (B2), preparados según el procedimiento descrito en el documento WO 02/092632. Además, el tratamiento posterior de estos concentrados de IgG por columnas de inmunoafinidad específicas reduce el título en anticuerpos anti-A en un factor cercano a 5, y en un factor cercano a 7 en anticuerpos anti-B (B3).

[0091] Otro procedimiento de determinación del contenido en anticuerpos anti-A y anti-B que puede aplicarse ventajosamente consiste en la lisis *in vitro* con el complemento, que se conoce por los expertos en la técnica, pero que se ha diseñado específicamente para las necesidades de la invención.

[0092] Dicho procedimiento de ensayo comprende las etapas que consisten en:

- A) Proceder a un radio-marcado de una suspensión de hematíes tratados con papaína escogidos entre los grupos sanguíneos A, B, AB y O, previamente contados, usando un marcador radiactivo adecuado,
- B) Poner en contacto los hematíes radiomarcados con muestras de concentrados de IgG en un volumen predeterminado,
- C) Añadir un volumen idéntico al de la etapa b) de suero normal del grupo sanguíneo AB,
- D) Incubar la mezcla obtenida en la etapa c) durante un tiempo predeterminado, y
- E) Medir la radioactividad de la solución incubada obtenida.

[0093] Se prepara una suspensión al 1% (v/v) de hematíes tratados con papaína del grupo sanguíneo A, B, AB o 0 que después es contada en una célula de Malassez para obtener 10^6 hematíes. Se añaden 100 μCi de ^{51}Cr (1 volumen por 1 volumen de hematíes). Se incuba el conjunto entre 1 y 2 horas, y después los hematíes radiomarcados se lavan entre 4 y 6 veces.

5 **[0094]** Después, los hematíes radiomarcados se ponen en contacto con muestras de concentrados de IgG a una concentración comprendida preferentemente entre 1 y 3 mg/ml, en particular 1,2 mg/ml por $4-6 \cdot 10^6$ hematíes radiomarcados, por ejemplo, en un volumen de 100 μl .

10 **[0095]** Después, a la mezcla anterior se le añade un volumen idéntico al volumen precedente, por ejemplo 100 μl de suero normal del grupo sanguíneo AB, para proporcionar los diferentes factores de complemento.

15 **[0096]** Después, la mezcla de reacción obtenida se incuba, preferentemente durante un tiempo comprendido entre 3 y 5 horas, en particular 4 horas, a una temperatura normalmente comprendida entre 30 °C y 40 °C, preferentemente 37 °C.

20 **[0097]** Después, preferentemente, la mezcla de reacción se centrifuga, y la radiactividad de la solución incubada se mide usando dispositivos adecuados disponibles en el mercado. La radiactividad medida de la solución es proporcional al índice de la hemólisis de los hematíes tratados y, por lo tanto, al contenido de anticuerpos anti-A y anti-B.

25 **[0098]** A modo de ejemplo, los índices de hemólisis de los hematíes de los grupos sanguíneos A, B y AB obtenidos considerando un concentrado de IgG de la invención (B3) y un concentrado de IgG de la técnica anterior (C1) que tiene los menores niveles de hemólisis entre todos los concentrados disponibles en el mercado, se indican en la siguiente Tabla 2:

Tabla 2

Índice de hemólisis de hematíes (%)	B3	C1 (técnica anterior)
Grupo A	6	13
Grupo B	5	11
Grupo C	6	13

30 **[0099]** Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones de la presente invención.

Ejemplo 1

35 **[0100]** Se obtiene una muestra de 40 g/l de concentrado de IgG (B2) siguiendo el procedimiento descrito en el documento WO 02/092632.

40 **[0101]** Una columna cromatográfica de 50 cm de longitud y 44 mm de diámetro se carga con una mezcla 50/50 (v/v) de medio GLYCOSORB ABO® injertado por trisacáridos correspondientes a los epítomos del grupo sanguíneo A y del grupo sanguíneo B, y después se somete a una etapa de lavado anterior con 1200 ml de agua.

45 **[0102]** El concentrado de IgG B2 se inyecta a razón de 0,2 l/ml de medio a través de una bomba. Una vez que este volumen se ha percolado a través de la columna, la columna se lava con un volumen mínimo de agua para preparación inyectable (PPI) con el fin de recuperar las IgG presentes en el volumen muerto de la columna.

50 **[0103]** Se recoge un concentrado de IgG B3 en aproximadamente 40 g/l empobrecidos de AcaA, AcaB y en IgG polireactivas, que después se somete a ultrafiltración de manera que el concentrado esté a 60 g/l y se lleve a nanofiltración para eliminar los virus en los tres filtros dispuestos en serie y con umbrales de retención decrecientes de 100, 50 y 20 nm.

55 **[0104]** La disolución de los excipientes estabilizantes que consisten en una mezcla de 7 g/l de glicina, 30 g/l de manitol y 20 ppm de Tween® 80 en el concentrado de IgG a 60 g/l se sigue de un ajuste de la concentración de IgG a 50 g/l usando agua PPI, después el concentrado se somete a filtración estéril y se divide en frascos.

Ejemplo 2 Cuantificación de Anti-A/B en las IgIV

1) Principio de ensayo:

1-1) Preparación de hematíes humanos

5 **[0105]** Las suspensiones de hematíes humanos del grupo A rhesus+, B rhesus+ u O rhesus+ se normalizan a una concentración de 40×10^6 hematíes/ml en tampón PBS + BSA al 1% a un pH = 7,4.

1-2) Preparación de la variedad anti-D monoclonal

10 **[0106]** Una preparación de anti-D monoclonal (denominada R297) se ensaya para comprobar la densidad óptica (DO) a 280 nm contra su tampón PBS de pH 7,4. El coeficiente de extinción molar (ϵ) de la proteína se calcula con respecto a su composición en diferentes aminoácidos, y la concentración (C) en anti-D monoclonal se obtiene aplicando la fórmula $C = DO/EI$, en la que I = anchura del recipiente para realizar la medición de la DO.

15 **[0107]** Se realiza un intervalo de 0 a 200 ng/ml de anticuerpos anti-D monoclonales en 12 puntos (200; 150; 100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 y 0 ng/ml).

1-3) Preparación de soluciones de inmunoglobulinas

20 **[0108]** Se estudiaron diferentes inmunoglobulinas intravenosas disponibles en el mercado. Las características principales de estas inmunoglobulinas se detallan en la tabla que se indica a continuación:

Denominación	Proveedor	Concentración
Inmunoglobulina polivalente	A	50 g/l
Inmunoglobulina polivalente	B	50 g/l
Inmunoglobulina humana intravenosa al 10%	C	100 g/l
IgNG 2(*)	LFB	50 g/l
IgNG 1 (**)	LFB	50 g/l
TEGELINE®	LFB	50 g/l
* Obtenidas siguiendo el procedimiento descrito en el documento WO 02/092632 seguido de la etapa de inmunoafinidad que se ha descrito en el Ejemplo 1 ** Obtenidas siguiendo el procedimiento descrito en el documento WO 02/092632 sin la etapa de inmunoafinidad tal como se ha descrito en el Ejemplo 1		

25 **[0109]** Las diferentes preparaciones de inmunoglobulinas se ajustan a una concentración de 1 mg/ml usando un tampón PBS + BSA al 1% con un pH = 7,4.

1-4) Sensibilización de hematíes

30 **[0110]** En una microplaca de fondo redondo se depositan en los pocillos:

- 50 μ l de la suspensión de hematíes A rhesus+, B rhesus+ u O rhesus+ con 40×10^6 hematíes/ml,
- 50 μ l del intervalo anti-D o 50 μ l de las muestras (IgIV) que se van a ensayar.

35 **[0111]** Las muestras que se van a ensayar se depositan en lotes triples.

[0112] Después, las placas se incuban durante 2 horas a 37 °C en agitación.

1-5) Lavados

40 **[0113]** Las placas se centrifugan durante 1 minuto en 770 g. El sobrenadante se descarta por inversión y después a cada pocillo se le añaden 200 μ l de PBS + BSA al 1%. La operación se repite 3 veces.

1-6) Adición de conjugado y lavados

[0114] Un F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana (Fc específico) marcado con ficoeritrina (FE) (Beckman Coulter Ref: PN IM0550) se diluye a 1/20⁸ en tampón PBS + BSA al 1% con un pH = 7,4, y después se depositan 50 µl de la solución en cada pocillo. Después, la placa se incuba durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se realizan 3 lavados sucesivos como se ha descrito en el epígrafe 1-5).

5

1-7) Lectura de la citometría de flujo

[0115] Las suspensiones de hematíes se leen en el citómetro de flujo (Beckman Coulter FC500) usando un programa adecuado. La lectura se realiza sobre 50.000 eventos, y el aparato calcula automáticamente la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada punto de calibración o muestra.

10

1-8) Interpretación de los resultados

[0116] La IMF se obtiene en relación a la concentración de anticuerpos anti-D monoclonales y la ecuación de regresión lineal se obtiene usando el software Excel. Después, para cada muestra, se obtiene la concentración en anticuerpos anti-D equivalentes utilizando la ecuación de regresión lineal. Puesto que las muestras se ensayaron por triplicado, se determina la concentración media y el coeficiente de variación se calcula usando el software Excel.

15

2) Resultados:

20

2-1) Concentración en anticuerpos anti-A

[0117]

Nombre	Hematíes O Rhesus+	Hematíes A rhesus+ (ng-Ig anti-A/mg de Ig)	CV (%)
Inmunoglobulina polivalente, A	ns	55,4	4,5
Inmunoglobulina polivalente, B	ns	44,4	3,4
Inmunoglobulina humana intravenosa al 10%, C	ns	117,9	14,6
IgNG 2	ns	22,2	5,5
IgNG 1	ns	119,8	4,9
TEGELINE	ns	35,6	5,0
Ns = no significativo			

25

[0118]

Nombre	Hematíes O Rhesus+	Hematíes A rhesus+ (ng-Ig anti-A/mg de Ig)	CV (%)
Inmunoglobulina polivalente, A	ns	64,0	0,9
Inmunoglobulina polivalente, B	ns	42,4	5,1
Inmunoglobulina humana intravenosa al 10%, C	ns	89,0	20,5
IgNG 2	ns	16	9,9

IgNG 1	ns	155,2	4,8
TEGELINE	ns	44,2	8,0
Ns = no significativo			

3) Conclusiones:

5 **[0119]** La etapa de afinidad contribuye realmente a la eliminación de los anticuerpos anti-A y anti-B. Entre las diferentes inmunoglobulinas estudiadas que están disponibles en el mercado, el producto IgNG2 es el producto que contiene el menor número de anticuerpos anti-A y anticuerpos anti-B.

Ejemplo 3

10 **[0120]** Se prepara una suspensión al 1% (v/v) de hematíes del grupo sanguíneo A en un tampón PBS, de pH al 7,4, que contiene albúmina sérica bovina BSA al 1% en peso. Se recogen 50 µl de la suspensión de hematíes y se añaden en un tubo del citómetro de flujo (Beckmann-Coulter Epics XL) junto con 50 µl de una solución de marcado interno que mide el flujo. La suspensión se calibra a 40.10⁶ hematíes/ml.

15 **[0121]** Se preparan ocho lotes de soluciones de IgG por dilución sucesiva en un factor 2 del concentrado de IgG (v/v) (B3) que se ha obtenido en el ejemplo 1, teniendo el lote más concentrado 30 g/l, teniendo el más diluido 0,234 g/l. Después, se pone un volumen de 50 µl de la suspensión en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos seguido de 50 µl de las diferentes soluciones de IgG diluidas.

20 **[0122]** El conjunto se deja incubar durante 2 h a una temperatura de 37 °C en agitación.

25 **[0123]** Después, cada pocillo se lava con 200 µl de tampón PBS que contiene la BSA anterior, y la microplaca se centrifuga durante 1 minuto a 2000 rpm. Después de la eliminación del sobrenadante, se añaden en cada pocillo 50 µl de una solución diluida con respecto a 1/20 para PBS-BSA de anticuerpos F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana con marcado con fluorocromo de ficoeritrina (Beckmann Coulter).

[0124] El conjunto se deja incubar durante 30 min en la oscuridad.

30 **[0125]** Después, la suspensión obtenida se lava como anteriormente.

[0126] El residuo de cada pocillo se disuelve en 100 µl de PBS-BSA. El volumen contenido en cada pocillo de la microplaca se transfiere a un tubo en el que se añaden 500 µl de líquido de revestimiento Isoflow (Coulter) y después se somete a citometría de flujo en un aparato Coulter-Beckmann Epics XL que comprende software para la adquisición de datos y el análisis de los resultados. Se mide la fluorometría para cada muestra.

[0127] Se realiza el mismo procedimiento para los hematíes del grupo sanguíneo B.

40 **[0128]** Se sigue este modo operativo para tres lotes diferentes de IgG (B3) y se aplica también a tres lotes diferentes de IgG preparados por fraccionamiento etanólico de acuerdo con el procedimiento de Cohn (que se ha citado anteriormente) (B1).

[0129] Los resultados obtenidos se proporcionan en la Tabla 3 que se indica a continuación.

45 Tabla 3

Muestras	Título de anticuerpos anti-A	Título de anticuerpos anti-B
B1	1	1
B2 (3 lotes)	3,80 ; 3,55 ; 3,59	3,80 ; 4,45 ; 3,31
B3 (3 lotes)	0,66 ; 0,68 ; 0,69	0,33 ; 0,73 ; 0,50

Ejemplo 4

50 **[0130]** Se prepara una suspensión al 1% (v/v) de hematíes tratados con papaína de los grupos sanguíneos A, B, AB ó O y se cuenta en una célula de Malassez para obtener 10⁶ hematíes. Se añaden 100 µCi de ⁵¹Cr (1 volumen por 1

ES 2 517 540 T3

volumen de hematíes). El conjunto se deja incubar durante 1 hora, y después los hematíes radiomarcados se lavan 5 veces.

5 **[0131]** Después, los hematíes radiomarcados se ponen en contacto con muestras de concentrados de IgG (B2) obtenidas en el ejemplo 1, a una concentración de 1,2 mg/ml por $5 \cdot 10^6$ hematíes radiomarcados, en un volumen de 100 μ l.

10 **[0132]** Después, a la mezcla anterior se le añade un volumen idéntico al anterior de 100 μ l de suero normal del grupo sanguíneo AB para proporcionar los diferentes factores del complemento.

[0133] Después, la mezcla de reacción obtenida se incuba durante 4 horas a una temperatura de 37 °C.

15 **[0134]** Después, la mezcla de reacción se centrifuga durante 1 minuto a 2000 rpm y la radioactividad de la solución de sobrenadante incubada se mide, usando dispositivos adecuados disponibles en el mercado. La radioactividad medida de la solución es proporcional al índice de hemólisis de los hematíes tratados y, por consiguiente, al contenido en anticuerpos anti-A y anti-B.

20 **[0135]** Se sigue con un procedimiento idéntico con hematíes de los grupos sanguíneos B, AB y O, siendo todos ellos rhesus+, y con una muestra de suero del grupo O+. Este modo operativo se continúa con tres lotes diferentes de IgG (B2).

[0136] Además, el procedimiento se aplica a tres lotes de muestras comerciales de concentrados de IgG, representados de C2 a C4, y una muestra C5 de suero del grupo O+, que se incluye como control negativo.

25 **[0137]** La radioactividad medida de la solución es proporcional al índice de hemólisis de los hematíes tratados y, por consiguiente, a la cantidad en anticuerpos anti-A y anti-B fijados sobre los hematíes.

[0138] Los resultados de la hemólisis obtenidos se representan en la Tabla 4 que se indica a continuación.

30

Tabla 4

Índice de hemólisis de hematíes (%)	B3	C2	C3	C4	C5
Grupo A+	6	16	13	30	34
	6,2	15,5	13,5	31	34,4
	6,5	16,3	13,2	31	34,6
Grupo B+	5	13,1	11,2	25	34
	4,8	13,3	10,8	25,3	34,4
	5,4	13,4	10,9	25,4	34,6
Grupo AB+	6	16	15,1	31	34
	5,9	15,7	15,1	31,4	34,4
	6,5	16,3	15,4	30,9	34,6
Grupo O+	0,1	0,2	0,22	0,33	2
	0,15	0,25	0,24	0,32	2,2
	0,12	0,21	0,24	0,30	2,7

35 **[0139]** Los resultados obtenidos muestran que el concentrado de IgG B3 que ha estado sometido a una cromatografía de afinidad según la invención, contiene la menor cantidad de AcaA y AcaB, dado que el índice de hemólisis de los hematíes que provienen de diferentes grupos sanguíneos es el más pequeño.

[0140] No se observa hemólisis con hematíes de fenotipo O +, que se incluyen como control negativo.

Ejemplo 5

5 [0141] La medida de la polireactividad de los concentrados de IgG B2 (antes de la cromatografía de inmunoafinidad) y después de esta cromatografía (concentrado de IgG B3) se ha descrito en el ejemplo 1.

10 [0142] La medida de la polireactividad de estos concentrados de IgG se realiza según la patente EP 1 059 088 usando dos antígenos que reaccionan con IgG polireactivas. Se trata de miosina y albúmina modificada por grupos de dinitrofenilo (Albúmina DNP).

15 [0143] La Tabla 5 presenta los factores de enriquecimiento de las IgG polireactivas en las muestras B2, B3 y C4 del ejemplo 3 cuyo contenido en IgG se ha establecido arbitrariamente en 1, en calidad de referencia.

[0144] Estas medidas se realizaron en tres lotes diferentes de los concentrados de IgG considerados.

Tabla 5

Muestra	Miosina	Albúmina DNP
B1	1	1
B2 (3 lotes)	1,2 ; 0,8 ; 1 ,2	3,2 ; 1,0 ; 2,0
B3 (3 lotes)	0,4 ; 0,4 ; 0,4	1,0 ; 1,0 ; 1,0
C4 (3 lotes)	2,0 ; 2,0 ; 2,0	8,0 ; 6,0 ; 7,0

20 [0145] Los resultados indican que el concentrado de IgG B3 de la invención contiene de 5 a 8 veces menos de IgG polireactivos que el concentrado de la técnica anterior C4.

25 Ejemplo 6

[0146] Ejemplo que compara la eficacia de los concentrados IgG (B3) empobrecidos en AcaA, AcaB, y en IgG polireactivas, con concentrados de IgG (B1).

30 [0147] El estudio incluyó ratones deficientes en receptores Fc γ RI y Fc γ RIII tratados con vistas a evaluar la actividad inmunomoduladora de los concentrados de IgG de la invención. Estos animales se usaron como modelo para púrpura trombocitopénica.

35 [0148] Se usó como control .un concentrado de IgG (B1) obtenido por fraccionamiento etanólico según Cohn.

[0149] Se aplicó el protocolo experimental descrito por Teeling J.L y col., (Blood, 15/08/2001, vol. 98, número 4, págs.1095-1099).

40 [0150] Las plaquetas, destruidas por inyección de IgG monoclonales antiplaquetarios de 9.10⁸/ml a 2.10⁸/ml, se elevan a 7.10⁸/ml en los animales tratados con los concentrados de IgG B1 y B3 a una dosis terapéutica de 1 g/kg.

[0151] La actividad inmunomoduladora del concentrado de IgG B3 según la invención no se modificó por la cromatografía de inmunoafinidad.

45

50

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un concentrado de IgG, que comprende las etapas de:

- 5 A) preparación de un concentrado de IgG por fraccionamiento etanólico y/o por separación cromatográfica, asociando una etapa de inactivación vírica,
 B) cromatografía de inmunoafinidad por percolación de dicho concentrado de IgG en una mezcla de medios cuyas matrices se injertan con los grupos N-acetilgalactosamina (GalNAc) - Galactosa (Gal) - Fucosa (Fuc) y Galactosa-Galactosa-Fucosa correspondientes a los epítomos de los grupos sanguíneos A y B, y
10 C) filtración de eliminación de virus y/o de partículas de tamaño superior a 20 nm.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa a) del procedimiento de la invención comprende una purificación previa por precipitación de contaminantes lipídicos a partir de un plasma sanguíneo o a partir de una fracción de plasma sanguíneo enriquecida con IgG, cromatografía sencilla en una resina de intercambio aniónico realizada a pH alcalino y una elución selectiva de las IgG en una etapa usando un tampón adecuado de pH entre 4 y 7.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la etapa de inactivación vírica se realiza con un disolvente-detergente.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la mezcla de soportes injertados con grupos que tienen una similitud antigénica con el grupo sanguíneo A y el grupo sanguíneo B tiene una proporción respectiva comprendida entre 25/75 y 75/25 (v/v), preferentemente 50/50 (v/v) en cada uno de los dichos soportes.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas de concentración por ultrafiltración y de filtración por esterilización.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la filtración de eliminación de los virus se realiza por nanofiltración.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende, después de la etapa c), una etapa para añadir estabilizantes para la conservación de dicho concentrado de IgG.