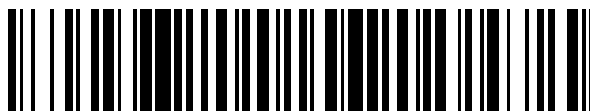


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 492**

51 Int. Cl.:

C07K 1/36 (2006.01)
A61K 35/16 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2010 E 10727539 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2445482**

54 Título: **Procedimiento para preparar una composición de IgG enriquecida a partir de plasma**

30 Prioridad:

26.05.2010 AU 2010202125

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

23.12.2014

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US y
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)

72 Inventor/es:

BRUCKSCHWAIGER, LEOPOLD;
SVATOS, SONJA;
NÜRNBERGER, JULIA;
TESCHNER, WOLFGANG;
BUTTERWECK, HARALD ARNO;
SCHWARZ, HANS-PETER;
GUNDINGER, THOMAS;
KOELBL, BERNHARD;
GRAUSENBURGER, REINHARD y
PLJEVLJAKOVIC, AZRA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 525 492 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para preparar una composición de IgG enriquecida a partir de plasma

5 Antecedentes de la invención

Los productos de inmunoglobulina de plasma humano se usaron por primera vez en 1952 para tratar una inmunodeficiencia. Inicialmente, la administración intramuscular o subcutánea del isotipo G de inmunoglobulina (IgG) eran los procedimientos de elección. Sin embargo, para inyectar mayores cantidades de IgG necesarias para un tratamiento eficaz de varias enfermedades, se desarrollaron los productos administrables por vía intravenosa con menor concentración de IgG (50 mg/ml). Normalmente, la inmunoglobulina intravenosa (IVIG), contiene las inmunoglobulinas de inmunoglobulina G (IgG) combinadas del plasma de más de mil donantes de sangre. Típicamente, contienen más de un 95 % de IgG no modificada, que tiene las funciones efectoras dependientes de Fc intactas, y solo cantidades mínimas de inmunoglobulina A (IgA) o inmunoglobulina M (IgM), las IVIG son productos de IgG purificados, estériles, usados principalmente en el tratamiento de tres categorías principales de afecciones médicas: (1) inmunodeficiencias tales como agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, hipogammaglobulinemia (inmunodeficiencias primarias), y afecciones de inmunidad deficiente adquirida (inmunodeficiencias secundarias), con niveles de anticuerpos bajos; (2) enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias; y (3) infecciones agudas.

Específicamente, muchas personas con trastornos de inmunodeficiencia primaria carecen de anticuerpos necesarios para resistir la infección. En determinados casos, estas deficiencias se pueden complementar por la infusión de IgG purificada, comúnmente a través de administración intravenosa (es decir, tratamiento con IVIG). Varios trastornos de inmunodeficiencia primaria se tratan comúnmente de esta manera, incluyendo agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (XLA), inmunodeficiencia variable común (CVID), síndrome hiper-IgM (HIM), inmunodeficiencia combinada grave (SCID), y algunas deficiencias de la subclase de IgG (Blaese y Winkelstein, J. Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases. Towson, MD: Immune Deficiency Foundation; 2007).

Aunque el tratamiento con IVIG puede ser muy eficaz para tratar trastornos de inmunodeficiencia primaria, este tratamiento solo es una sustitución temporal para los anticuerpos que no se producen en el cuerpo, más que una cura para la enfermedad. En consecuencia, los pacientes dependientes del tratamiento con IVIG requieren dosis repetidas, típicamente, de aproximadamente una vez al mes de por vida. Esta necesidad supone una gran demanda de una producción continuada de composiciones de IVIG. Sin embargo, a diferencia de otros productos biológicos que se producen por medio de la expresión in vitro de vectores de ADN recombinante, la IVIG se fracciona a partir de donantes de sangre y plasma humanos. Por lo tanto, no se pueden incrementar los productos de IVIG incrementando simplemente el volumen de producción. Más bien el nivel de IVIG disponible comercialmente está limitado por el suministro disponible de donaciones de sangre y plasma.

Varios factores impulsan la demanda de IVIG, incluyendo la aceptación de tratamientos con IVIG, la identificación de indicaciones adicionales para las que el tratamiento con IVIG es eficaz, y el incremento del diagnóstico del paciente y la prescripción de IVIG. Notablemente, la demanda global de IVIG se ha más que cuadruplicado desde 1990 y continúa incrementándose en la actualidad a una tasa anual de entre aproximadamente un 7 % y un 10 % (Robert P., Pharmaceutical Policy and Law, 11 (2009) 359-367). Por ejemplo, la Australian National Blood Authority informó de que la demanda de IVIG en Australia creció un 10,6 % durante el año presupuestario 2008-2009 (National Blood Authority Australia Annual Report 2008-2009).

Debido en parte al incremento de la demanda global y de las fluctuaciones en el suministro disponible de productos de inmunoglobulina, varios países, incluyendo Australia e Inglaterra, han implementado programas de gestión de la demanda para proteger los suministros de estos productos para los pacientes con la mayor demanda durante épocas de escasez de productos.

Se ha informado de que en 2007, se fraccionaron 26,5 millones de litros de plasma, generando 75,2 toneladas métricas de IVIG, con un promedio del rendimiento de producción de 2,8 gramos por litro (Robert P., supra). Este mismo informe estimó que se esperaba que los rendimientos globales de IVIG se incrementaran aproximadamente 3,43 gramos por litro en 2012. Sin embargo, debido al crecimiento continuado de la demanda global de IVIG, extrapolada entre aproximadamente un 7 % y un 13 % anual entre ahora y el 2015, se necesitará una mejora adicional en el rendimiento de IVIG total para cumplir con la demanda global.

Se usan varios procedimientos de preparación de IVIG por proveedores comerciales de los productos de IVIG. Un problema común con los procedimientos de producción de IVIG actuales es la pérdida sustancial de IgG durante el procedimiento de purificación, que se estima que es al menos de un 30 % a un 35 % del contenido de IgG total del material de partida. Un reto es mantener la calidad de la inactivación vírica y la falta de impurezas que puedan provocar reacciones adversas, reforzando mientras el rendimiento de IgG. En los niveles de producción actuales de IVIG, lo que se considera pequeños incrementos en el rendimiento son, de hecho, altamente significativos. Por ejemplo, en los niveles de producción en 2007, un incremento de un 2 % en la eficacia, igual a 56 miligramos adicionales por litro, generarían 1,5 toneladas métricas adicionales de IVIG.

Los documentos DE 100 08 619, EP 0 893 450, US 4 550 019 divulgan procedimientos para la fabricación de composiciones de inmunoglobulina. Lo mismo se aplica a: documentos US 6 150 471, US 4 499 073; Cammerata-P.B., Cohen-P.P. Fractionation and Properties of Glutamic-Oxalacetic Transaminase. *Jbc.org*. 1981. 53-62. Curling-J-M. Methods of Plasma Protein Fractionation. Academic Press. 1980.

En la cuarta entrega de una serie de artículos influyentes publicados sobre la preparación y las propiedades de las proteínas del suero y del plasma, Cohn et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68(3): 459-475) describieron por primera vez un procedimiento para el fraccionamiento con alcohol de proteínas del plasma (procedimiento 6), que permite el aislamiento de una fracción enriquecida en IgG a partir de plasma humano. Varios años después, Oncley et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71(2): 541-550) ampliaron los procedimientos de Cohn publicando un procedimiento (procedimiento 9) que dio como resultado el aislamiento de una preparación de IgG más pura.

Estos procedimientos, aunque sientan las bases para toda la industria de los factores sanguíneos derivados de plasma, no pudieron proporcionar preparaciones de IgG que tuvieran concentraciones suficientemente altas para el tratamiento de varias enfermedades inmunorrelacionadas, incluyendo síndrome de Kawasaki, púrpura trombocitopénica inmunitaria e inmunodeficiencias primarias. Como tales, se desarrollaron metodologías adicionales que empleaban varias técnicas, tales como cromatografía de intercambio iónico, para proporcionar formulaciones de IgG con mayor pureza y mayor concentración. Hoppe et al. (*Munch Med Wochenschr* 1967 (34): 1749-1752) y Falksveden (patente sueca n.º 348942) y Falksveden y Lundblad (*Methods of Plasma Protein Fractionation* 1980) estaban entre los primeros en emplear la cromatografía de intercambio iónico con este propósito.

Varios procedimientos modernos emplean una etapa de precipitación, tal como precipitación con caprilato (Lebing et al., *Vox Sang* 2003 (84):193-201) y precipitación con etanol de la fracción (I+II+III) de Cohn (Tanaka et al., *Braz J Med Biol Res* 2000 (33):37-30) acoplada a cromatografía en columna. Más recientemente, Teschner et al. (*Vox Sang*, 2007 (92):42-55) han descrito un procedimiento para la producción de un producto de IVIG al 10 % en el que, en primer lugar, se retira el crioprecipitado de los plasmas combinados y, a continuación, se realiza un fraccionamiento con etanol frío de Cohn-Oncley modificado, seguido del tratamiento S/D del intermedio, cromatografía de intercambio iónico, nanofiltración, y opcionalmente ultrafiltración/diafiltración.

Sin embargo, a pesar de la mejora en pureza, seguridad y rendimiento proporcionada por estos procedimientos de fabricación de IgG, aún se pierde una cantidad significativa de IgG durante el procedimiento de fabricación. Por ejemplo, Teschner et al. informaron de que su procedimiento da como resultado un incremento en el rendimiento de IgG de un 65 % (Teschner et al., *supra*). Tal como se informó durante varias reuniones sobre productos de plasma, el promedio de los rendimientos para la preparación a gran escala de IgG, tales como de Baxter, CSL Behring, Upfront Technology, Cangene, Prometric BioTherapeutics, y la Cruz Roja de Finlandia, varía de aproximadamente un 61 % a aproximadamente un 65 % en el recipiente final. Esto representa una pérdida de al menos aproximadamente un tercio de la IgG presente en la fracción de plasmas combinados durante el procedimiento de fabricación.

Como tal, existe una necesidad de procedimientos mejorados y más eficaces para fabricar productos de IVIG. La presente invención satisface estas y otras necesidades proporcionando procedimientos de fabricación de IVIG que producen rendimientos que son al menos de un 6 a un 10 % mayores que los alcanzables en la actualidad, así como composiciones de IVIG proporcionadas a partir de los mismos.

Breve resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para preparar composiciones de IgG enriquecidas (por ejemplo, composiciones de IVIG) a partir de plasma de acuerdo con la reivindicación 1. De forma ventajosa, los procedimientos proporcionados en el presente documento proporcionan mejoras significativas sobre los procedimientos de fabricación del estado de la técnica actual para preparar composiciones de IVIG. Por ejemplo, los procedimientos proporcionados en el presente documento permiten un incremento en los rendimientos de IgG en la composición a granel final sin perder la pureza requerida para su administración intravenosa.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para preparar una composición de IgG enriquecida a partir de plasma que comprende las etapas de (a) precipitar una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado, en una primera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 10 % a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante, (b) precipitar la IgG del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 25 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado, (c) resuspender el segundo precipitado para formar una suspensión, (d) precipitar la IgG de la suspensión formada en la etapa (c), en una tercera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 22 % y aproximadamente un 28 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un tercer precipitado, (e) resuspender el tercer precipitado para formar una suspensión, y (f) separar la fracción soluble de la suspensión formada en la etapa (e), formando de este modo una composición de IgG enriquecida, en el que al menos una de las primera etapa de precipitación, segunda de precipitación, o tercera etapa de precipitación comprende la adición por pulverización del alcohol. En un modo de realización, se añade alcohol en la primera etapa de precipitación por pulverización. En otro modo de realización, se añade alcohol en la segunda etapa de precipitación

por pulverización. Aún en otro modo de realización, se añade alcohol en la tercera etapa de precipitación por pulverización.

En determinados modos de realización, se puede ajustar el pH de una o más soluciones por la adición de un agente modificador de pH por pulverización. En modos de realización relacionados, se logra el pH de al menos una de las primera etapa de precipitación, segunda etapa de precipitación o tercera etapa de precipitación por la adición de una solución modificadora de pH después de la adición del alcohol, o antes y después de la adición de alcohol, durante y después de la adición de alcohol, o antes, durante, y después de la adición de alcohol. Aún en otro modo de realización relacionado, se puede mantener el pH de una etapa de precipitación durante toda la reacción de precipitación ajustando continuamente el pH.

En un modo de realización específico, se ajusta el pH de la primera etapa de precipitación después de la adición de alcohol por adición por pulverización de un agente modificador de pH. En otro modo de realización específico, se ajusta el pH de la segunda etapa de precipitación después de la adición de alcohol por adición por pulverización de un agente modificador de pH. Aún en otro modo de realización específico, se ajusta el pH de la tercera etapa de precipitación después de la adición de alcohol por adición por pulverización de un agente modificador de pH.

Adicionalmente, los procedimientos preparatorios proporcionados en el presente documento pueden comprender además una etapa de cromatografía de intercambio iónico (es decir, cromatografía de intercambio aniónico y/o de intercambio catiónico), una etapa de nanofiltración, una etapa de ultrafiltración/diafiltración, o cualquier otra técnica de purificación adecuada para potenciar adicionalmente la pureza o calidad de las preparaciones de IVIG.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para preparar una composición de IgG enriquecida a partir de plasma, comprendiendo las etapas de (a) ajustar el pH de una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado hasta o hasta aproximadamente 7,0, (b) ajustar la concentración de etanol de la fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado de la etapa (a) hasta un o aproximadamente un 25 % (v/v) a una temperatura entre o entre aproximadamente -7 °C y o aproximadamente -9 °C, formando de este modo una mezcla, (c) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (b), (d) resuspender el precipitado de la etapa (c) con un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con o con aproximadamente 600 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una suspensión, (e) mezclar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (d) durante al menos aproximadamente 30 minutos, (f) filtrar la suspensión con un filtro-prensa, formando de este modo un filtrado, (g) lavar el filtro-prensa con al menos 3 volúmenes muertos de filtro-prensa de un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con o con aproximadamente 150 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una solución de lavado, (h) combinar el filtrado de la etapa (f) con la solución de lavado de la etapa (g), formando de este modo una solución, y tratar la solución con un detergente, (i) ajustar el pH de la solución de la etapa (h) hasta o hasta aproximadamente 7,0 y añadir etanol hasta una concentración final de un o aproximadamente un 25 %, formando de este modo un precipitado, (j) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (i), (k) disolver el precipitado en una solución acuosa que comprende un disolvente o detergente y mantener la solución durante al menos 60 minutos, (l) hacer pasar la solución después de la etapa (k) a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico y eluir las proteínas absorbidas en la columna en un eluato, (m) hacer pasar el eluato de la etapa (l) a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para generar un efluente, (n) hacer pasar el efluente de la etapa (m) a través de un nanofiltro para generar un nanofiltrado, (o) hacer pasar el nanofiltrado de la etapa (n) a través de una membrana de ultrafiltración para generar un ultrafiltrado, y (p) someter a diafiltración el ultrafiltrado de la etapa (o) contra un tampón de diafiltración para generar un diafiltrado que tiene una concentración de proteína entre aproximadamente un 8 % (p/v) y aproximadamente un 12 % (p/v), obteniendo de este modo una composición de IgG concentrada.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones de IgG acuosas preparadas por los procedimientos descritos en el presente documento. En general, las composiciones de IgG tienen una pureza alta (por ejemplo, contenido en IgG al menos de un 95 %, 98 %, 99 %, o mayor), contienen concentraciones de proteína de entre aproximadamente 20 g/l y aproximadamente 200 g/l, y contienen niveles extremadamente bajos de contaminantes de IVIG comunes, tales como IgG, IgM, fibrinógeno, transferrina, ACA, actividad amidolítica, PKA, y similares.

Aún en otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas de IgG y formulaciones adecuadas para su uso en tratamientos con IVIG. Las formulaciones farmacéuticas tienen una pureza alta (por ejemplo, contenido en IgG al menos de un 98 %, 99 %, o mayor), contienen concentraciones de proteína de entre aproximadamente 20 g/l y aproximadamente 200 g/l, y contienen niveles extremadamente bajos de contaminantes de IVIG comunes, tales como IgG, IgM, fibrinógeno, transferrina, ACA, actividad amidolítica, PKA, y similares. En general, las composiciones farmacéuticas se formulan de forma apropiada para su administración intravenosa (es decir, para tratamiento con IVIG), administración subcutánea o administración intramuscular.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para tratar una inmunodeficiencia, enfermedad autoinmunitaria o infección aguda, en un ser humano que lo necesite, comprendiendo el procedimiento administrar una composición farmacéutica descrita en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y afecciones que se pueden tratar o gestionar a través de los procedimientos proporcionados en el

presente documento incluyen alotrasplante de médula ósea, leucemia linfocítica crónica, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), VIH infantil, inmunodeficiencias primarias, enfermedad de Kawasaki, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), trasplante de riñón con un receptor de anticuerpos alto o con donante ABO incompatible, síndrome de fatiga crónica, colitis por *Clostridium difficile*, dermatomiositis y polimiositis, oftalmopatía de Graves, síndrome de Guillain-Barre, distrofia muscular, miositis de cuerpos de inclusión, síndrome de Lambert-Eaton, lupus eritematoso, neuropatía motora multifocal, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave, trombocitopenia aloinmunitaria neonatal, infección por Parvovirus B19, pénfigo, púrpura post-transfusión, rechazo a trasplante renal, aborto espontáneo/natural, síndrome del hombre rígido, opsoclonía-mioclónia, septicemia grave o choque septicémico en enfermos adultos críticos, necrosis epidérmica tóxica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, hipogammaglobulinemia, inmunodeficiencia primaria, RRMS, enfermedad de Alzheimer, y enfermedad de Parkinson.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Concentración de IgG determinada por procedimientos de ELISA (▲) y nefelometría (●) y concentración de proteína total (■) presente en el lavado de filtrado de la fracción II+III en función del número de volúmenes muertos de tampón usados para lavar el dispositivo de filtración después de la filtración.

Figura 2: Promedio de la actividad de PKA en fracciones disueltas del precipitado G después de la extracción y aclarado a pH de 3,8 a 5,0 por adición de ácido acético en presencia y ausencia de tratamiento con Aerosil (dióxido de silicio).

Figura 3: Promedio del contenido en fibrinógeno en fracciones disueltas del precipitado G después de la extracción y aclarado a pH de 3,8 a 5,0 por adición de ácido acético en presencia y ausencia de tratamiento con Aerosil (dióxido de silicio).

Figura 4: Promedio de la actividad amidolítica en fracciones disueltas del precipitado G después de la extracción y aclarado a pH de 3,8 a 5,0 por adición de ácido acético en presencia y ausencia de tratamiento con Aerosil (dióxido de silicio).

Figura 5: Actividad amidolítica en fracciones disueltas de precipitado G extraídas y aclaradas a pH de 3,8 a 7,8 después de incubación durante dos semanas a 4 °C (♦) o durante una semana adicional a temperatura ambiente (■).

Figura 6: Actividad de PKA en fracciones disueltas de precipitado G extraídas y aclaradas a pH de 3,8 a 7,8.

Figura 7: Diferencia en la pureza del filtrado de la fracción II+III modificada con y sin tratamiento de sílice de combustión. Cromatografía de electroforesis con acetato de celulosa del filtrado de la fracción II+III modificada (A) aclarado solo con coadyuvante de filtro y (B) aclarado después de tratamiento con sílice de combustión.

Figura 8: Cambio en el pH de 6,9 del sobrenadante de la fracción II+III después de la adición de alcohol en precipitación en la fabricación de IgG a gran escala.

Figura 9: Cantidad de ácido acético glacial frente a pH en el tampón de extracción del precipitado de la fracción II+III modificada.

Figura 10: Cantidad de ácido acético glacial frente a pH en el tampón de lavado posterior del filtro de la suspensión de la fracción II+III modificada.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" se refiere a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos del mismo, que se une específicamente y reconoce un analito (antígeno). Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o bien lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Una unidad estructural de inmunoglobulina ejemplar (anticuerpo) está compuesta de dos pares de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. Los términos de cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "ultrafiltración (UF)" engloba una variedad de procedimientos de filtración de membrana en los que la presión hidrostática fuerza un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos suspendidos y solutos de alto peso molecular quedan retenidos, mientras que el agua y los solutos de bajo

peso molecular pasan a través de la membrana. Este procedimiento de separación se usa a menudo para purificar y concentrar soluciones macromoleculares (10^3 - 10^6 Da), en especial soluciones de proteínas. Están disponibles varias membranas de ultrafiltración dependiendo del tamaño de las moléculas que retienen. Típicamente, la ultrafiltración se caracteriza por un tamaño de poro de membrana de entre 1 y 1000 kDa y presiones de funcionamiento de entre 0,01 y 10 , y es particularmente útil para separar coloides como proteínas de moléculas pequeñas como azúcares y sales.

Como se usa en el presente documento, el término "diafiltración" se realiza con las mismas membranas que la ultrafiltración y es una filtración de flujo tangencial. Durante la diafiltración, se introduce el tampón en el depósito de reciclado mientras que se retira el filtrado del funcionamiento de la unidad. En procedimientos en los que el producto está en el retenido (por ejemplo IgG), la diafiltración separa por lavado los componentes del combinado de productos en el filtrado, intercambiando de este modo tampones y reduciendo la concentración de especies no deseadas.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" indica un intervalo aproximado de más o menos un 10 % de un valor específico. Por ejemplo, el lenguaje "aproximadamente un 20 %" engloba un intervalo de un 18-22 %.

Como se usa en el presente documento, el término "mezclar" describe un acto de provocar una distribución equitativa de dos o más compuestos o sustancias distintas en una solución o suspensión por cualquier forma de agitación. No se requiere la distribución equitativa completa de todos los ingredientes en una solución o suspensión como resultado de "mezclar" como se usa el término en esta solicitud.

Como se usa en el presente documento, el término "disolvente" engloba cualquier sustancia líquida que puede disolver o dispersar una o más de otras sustancias. Un disolvente puede ser de naturaleza inorgánica, tal como agua, o puede ser un líquido orgánico, tal como etanol, acetona, acetato de metilo, acetato de etilo, hexano, éter de petróleo, etc. Como se usa en el término "tratamiento de detergente de disolvente", disolvente indica un disolvente orgánico (por ejemplo, tri-N-butilfosfato), que es parte de la mezcla de detergente de disolvente usada para inactivar los virus con envoltura lipídica en solución.

Como se usa en el presente documento, el término "detergente" se usa en esta solicitud de manera intercambiable con el término "tensoactivo" o "agente de acción en superficie". Típicamente, los tensioactivos son compuestos orgánicos que son anfifílicos, es decir, que contienen tanto grupos hidrófobos ("colas") como grupos hidrófilos ("cabezas"), que hacen que los tensioactivos sean solubles tanto en disolventes orgánicos como en agua. Se puede clasificar un tensioactivo por la presencia de grupos formalmente cargados en su cabeza. Un tensioactivo no iónico no tiene grupos cargados en su cabeza, mientras que un tensioactivo iónico lleva una carga neta en su cabeza. Un tensioactivo bipolar contiene una cabeza con dos grupos con carga opuesta. Algunos ejemplos de tensioactivos comunes incluyen: aniónicos (basados en aniones sulfato, sulfonato o carboxilato): perfluorooctanoato (PFOA o PFO), sulfonato de perfluorooctano (PFOS), dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de amonio, y otras sales de sulfato de alquilo, lauriletersulfato de sodio (también conocido como lauril éter sulfato de sodio, o SLES), sulfonato de alquilbenceno; catiónicos (basados en cationes de amonio cuaternario): bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) también denominado bromuro de hexadeciltrimetilamonio, y otras sales de alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio (CPC), amina de sebo polietoxilado (POEA), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de bencetonio (BZT); ácidos grasos de cadena larga y sus sales: incluyendo caprilato, ácido caprílico, heptanoato, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido nanoico, ácido decanoico, y similares; bipolares (anfóteros): dodecilm-betaína; cocamidopropil-betaína; cocoanfoglucinato; no iónicos: poli(óxido de etileno) de alquilo, poli(óxido de etileno) de alquilfenol, copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de polipropileno) (comercialmente conocidos como poloxámeros o poloxaminas), alquilpoliglucósidos, incluyendo octilglucósido, decilmaltósido, alcoholes grasos (por ejemplo, alcohol cetílico y alcohol oleílico), cocamida MEA, cocamida DEA, polisorbatos (Tween 20, Tween 80, etc.), detergentes Triton, y óxido de dodecildimetilamina.

Como se usa en el presente documento, el término tratamiento con "IgG intravenosa" o "IVIG" se refiere, en general, a un procedimiento terapéutico de administración intravenosa, subcutánea o intramuscular de una composición de inmunoglobulinas IgG a un paciente para tratar varias afecciones tales como inmunodeficiencias, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias. Típicamente, las inmunoglobulinas IgG se combinan y se preparan a partir de plasma. Se pueden usar anticuerpos completos o fragmentos. Las inmunoglobulinas IgG se pueden formular en concentraciones mayores (por ejemplo, mayores de un 10 %) para administración subcutánea, o se pueden formular para administración intramuscular. Esto es particularmente común para preparaciones de IgG especializadas que se preparan con títulos mayores que el promedio para antígenos específicos (por ejemplo, factor Rho D, toxina pertúsica, toxina tetánica, toxina botulínica, rabia, etc.). Para facilitar el análisis, dichas composiciones de IgG formuladas por vía subcutánea o intramuscular también se incluyen en el término "IVIG" en esta solicitud.

Por el término "cantidad o dosis terapéuticamente eficaz" o "cantidad o dosis suficiente/eficaz", se quiere decir una dosis que produce los efectos por los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y será determinable por un experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vol. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Como se usa en esta solicitud, el término "pulverizar" se refiere a un medio de administrar una sustancia líquida en un sistema, por ejemplo, durante una etapa de precipitación de alcohol, tal como una etapa de precipitación I o II+III de fraccionamiento de Cohn modificado, en forma de gotitas o vaporización fina de la sustancia líquida. Se puede lograr la pulverización por cualquier dispositivo presurizado, tal como un recipiente (por ejemplo, un frasco pulverizador), que

Descripción detallada de la invención:

I. Visión general

Como se practica de forma rutinaria en la medicina moderna, se usan preparaciones esterilizadas de inmunoglobulinas concentradas (en especial IgG) para tratar afecciones médicas que entran dentro de tres clases principales: deficiencias inmunitarias, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, e infecciones agudas. Un producto de IgG usado comúnmente, inmunoglobulina intravenosa o IVIG, se formula para administración intravenosa, por ejemplo, en una concentración de IgG de o de aproximadamente un 10 %. Las inmunoglobulinas concentradas también se pueden formular para administración subcutánea o intramuscular, por ejemplo, en una concentración de IgG de o de aproximadamente un 20 %. Para facilitar el análisis, dichas composiciones de IgG formuladas por vía subcutánea o intramuscular también se incluyen en el término "IVIG" en esta solicitud.

En determinados aspectos, la presente invención proporciona procedimientos para la fabricación de IVIG que incrementan el rendimiento final del producto, aún proporcionan composiciones de IVIG de calidad igual o mayor y en algunos casos concentraciones mayores. En un modo de realización, la presente invención proporciona procedimientos de fraccionamiento de Cohn modificado que reducen la pérdida de IgG en una o más etapas de precipitación.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones de IgG preparadas de acuerdo con una mejora en los procedimientos de fabricación proporcionados en el presente documento. De forma ventajosa, estas composiciones son menos caras de preparar que los productos comerciales actualmente disponibles debido a la mejora en el rendimiento proporcionada por los procedimientos proporcionados en el presente documento. Además, estas composiciones son tan puras, o más puras, que las composiciones fabricadas usando procedimientos comerciales. De forma importante, estas composiciones son adecuadas para su uso en tratamiento con IVIG para inmunodeficiencias, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, e infecciones agudas. En un modo de realización, la composición de IgG tiene IgG al o aproximadamente al 10 % para administración intravenosa. En otro modo de realización, la composición de IgG es de o de aproximadamente un 20 % para administración subcutánea o intramuscular.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas y formulaciones de composiciones de IgG preparadas de acuerdo con la mejora en las metodologías de fabricación proporcionadas en el presente documento. En determinados modos de realización, estas composiciones y formulaciones proporcionan una mejora en las propiedades en comparación con otras composiciones de IVIG actualmente en el mercado. Por ejemplo, en determinados modos de realización, las composiciones y formulaciones proporcionadas en el presente documento son estables durante un periodo de tiempo prolongado.

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar inmunodeficiencias, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, e infecciones agudas que comprende la administración de una composición de IgG preparada usando la mejora en los procedimientos proporcionados en el presente documento.

II. Procedimientos de fabricación de IVIG

En general, se pueden preparar preparaciones de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención a partir de cualquier material de partida adecuado, por ejemplo, plasma recuperado o plasma de fuente. En un ejemplo típico, se recoge sangre o plasma de donantes sanos. Normalmente, se recoge sangre de la misma especie de animal que el sujeto al que se le administrará la preparación de inmunoglobulina (denominadas típicamente inmunoglobulinas "homólogas"). Las inmunoglobulinas se aíslan de la sangre por procedimientos adecuados, tales como, por ejemplo, precipitación (fraccionamiento de alcohol o fraccionamiento de polietilenglicol), procedimientos cromatográficos (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de inunoafinidad, etc.) ultracentrifugación, y preparación electroforética, y similares. (Véase, por ejemplo, Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Oncley et al., J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Barundem et al., Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet et al., Vox Sang. 13:93-102 (1967); patentes de EE. UU. n.º 5.122.373 y 5.177.194; de los que las divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos).

En muchos casos, las inmunoglobulinas se preparan a partir de productos que contienen gammaglobulina producidos por fraccionamiento con alcohol y/o procedimientos de cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad

bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la fracción II de Cohn purificada se usa comúnmente como punto de partida para el aislamiento de inmunoglobulinas. Típicamente, la pasta de la fracción II de Cohn de partida tiene IgG aproximadamente al 95 por ciento y está compuesta de los cuatro subtipos de IgG. Los diferentes subtipos están presentes en la fracción II aproximadamente en la misma proporción en la que se encuentran en los plasmas humanos combinados a partir de la que se obtienen. La fracción II se purifica adicionalmente antes de la formulación en un producto administrable. Por ejemplo, se puede disolver la pasta de la fracción II en una solución de alcohol acuosa purificada y se pueden retirar las impurezas por medio de precipitación y filtración. Después de la filtración final, la suspensión de inmunoglobulina se puede someter a dialización o diafiltración (por ejemplo, usando membranas de ultrafiltración que tienen un límite de peso molecular nominal menor de o igual a 100.000 daltons) para retirar el alcohol. La solución se puede concentrar o diluir para obtener la concentración de proteína deseada y se puede purificar adicionalmente por técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

Además, se pueden usar etapas preparativas adicionales para enriquecer un isotipo o subtipo particular de inmunoglobulina. Por ejemplo, se puede usar cromatografía con proteína A, proteína G o proteína H Sepharose para enriquecer una mezcla de inmunoglobulinas para IgG, o para subtipos de IgG específicos. En general, véase, Harlow y Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); y la patente de los EE. UU. n.º 5.180.810, de los que las divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

A diferencia de los procedimientos descritos anteriormente, en un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de preparación de composiciones de IgG concentradas que utilizan un material de partida desprovisto de crioprecipitado. En general, los procedimientos proporcionados en el presente documento utilizan tanto etapas de fraccionamiento con alcohol de Cohn-Oncley modificado como cromatografía de intercambio iónico para proporcionar rendimientos de IgG superiores, mientras que mantienen la misma calidad, o mejorada, como se encuentra en las preparaciones de IVIG comerciales actualmente disponibles. Por ejemplo, en determinados modos de realización, se proporcionan procedimientos que proporcionan una composición de IgG a granel final que contiene casi un 75 % del contenido en IgG encontrado en la materia prima de plasma de partida. Estos procedimientos representan un incremento al menos de un 10 % a un 12 % en el rendimiento de IgG total sobre los procedimientos de purificación del estado de la técnica existentes. Por ejemplo, se estima que el procedimiento de fabricación GAM-MAGARD® LIQUID proporciona un rendimiento final de entre aproximadamente un 60 % y un 65 % del contenido en IgG encontrado en el material de partida. Como tal, los procedimientos proporcionados en el presente documento proporcionan una mejora significativa sobre las tecnologías de purificación de IgG existentes.

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición de IgG purificada que contiene al menos un 70 % del contenido en IgG encontrado en la materia prima de plasma de partida. En otro modo de realización, se proporciona una composición de IgG purificada que contiene al menos un 75 % del contenido en IgG encontrado en la materia prima de plasma de partida. En otros modos de realización, una composición de IgG purificada proporcionada en el presente documento contendrá al menos aproximadamente un 65 % del contenido en IgG encontrado en la materia prima de plasma de partida, o al menos un 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, o más del contenido en IgG encontrado en la materia prima de plasma de partida.

A. Procedimientos de fraccionamiento de precipitación de alcohólico modificado/cromatografía de intercambio iónico

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos mejorados para la fabricación de composiciones de IgG adecuadas para su uso en tratamiento con IVIG. En general, estos procedimientos proporcionan preparaciones de IgG que tienen mayores rendimientos y pureza comparable, si no mayor, que los procedimientos actuales empleados para la producción de productos de IVIG comerciales.

En un aspecto específico, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de IgG concentrada de plasma, por ejemplo, IVIG al 10 %, comprendiendo el procedimiento realizar al menos una etapa de precipitación de alcohol y al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico. En particular, varias etapas en el proceso previo mejorado son diferentes de los procedimientos anteriores, por ejemplo, el uso de etanol al 25 % a temperaturas menores, adición de etanol por pulverización, ajuste de pH por pulverización y el uso de partículas de sílice finamente dividido.

En un determinado modo de realización, el procedimiento comprende las etapas de (a) precipitar una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado, en una primera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 10 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para obtener un sobrenadante enriquecido en IgG, (b) precipitar IgG del sobrenadante con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 30 % a una temperatura menor y a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un primer precipitado, (c) resuspender el primer precipitado formado en la etapa (b) para formar una suspensión, (d) tratar la suspensión formada en la etapa (c) con un detergente, (e) precipitar IgG de la suspensión con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 30 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado, (f) resuspender el segundo precipitado formado en la etapa (e) para formar una suspensión, (g) tratar la suspensión formada en la etapa (f) con un disolvente y/o detergente, y (h) realizar al menos un fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico preparando de este modo una

composición de IgG concentrada. En un modo de realización, el procedimiento comprende además tratar la suspensión formada en la etapa (c) con dióxido de silíce (SiO_2) finamente dividido y filtrar la solución anterior a la etapa (d).

En un modo de realización, se proporciona un procedimiento para preparar una composición de IgG concentrada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) ajustar el pH de una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado hasta aproximadamente 7,0, (b) ajustar la concentración de etanol de la fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado de la etapa (a) hasta un o aproximadamente un 25 % (v/v) a una temperatura entre aproximadamente -5 °C y aproximadamente -9 °C, formando de este modo una mezcla, en el que la concentración de etanol se puede ajustar por pulverización, (c) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (b), (d) resuspender el precipitado de la etapa (c) con un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con entre aproximadamente 400 y aproximadamente 700 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una suspensión, (e) mezclar dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido con la suspensión de la etapa (d) durante al menos aproximadamente 30 minutos, (f) filtrar la suspensión con un filtro-prensa, formando de este modo un filtrado, (g) lavar el filtro-prensa con al menos 3 volúmenes muertos de filtro-prensa de un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con aproximadamente 150 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una solución de lavado, (h) combinar el filtrado de la etapa (f) con la solución de lavado de la etapa (g), formando de este modo una solución, y tratar la solución con un detergente, (i) ajustar el pH de la solución de la etapa (h) hasta aproximadamente 7,0 y añadir etanol hasta una concentración final de un o aproximadamente un 25 %, formando de este modo un precipitado, en el que la concentración de etanol y/o el pH se pueden ajustar por pulverización (j) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (i), (k) disolver el precipitado en una solución acuosa que comprende un disolvente o detergente y mantener la solución durante al menos 60 minutos, (l) hacer pasar la solución después de la etapa (k) a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico y eluir las proteínas absorbidas en la columna en un eluato, (m) hacer pasar el eluato de la etapa (l) a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para generar un efluente (es decir, flujo a través), (n) hacer pasar el efluente de la etapa (m) a través de un nanofiltro para generar un nanofiltrado, (o) hacer pasar el nanofiltrado de la etapa (n) a través de una membrana de ultrafiltración para generar un ultrafiltrado, y (p) someter a diafiltración el ultrafiltrado de la etapa (o) contra un tampón de diafiltración para generar un diafiltrado que tiene una concentración de proteína entre aproximadamente un 8 % (p/v) y aproximadamente un 22 % (p/v), obteniendo de este modo una composición de IgG concentrada. En un modo de realización, la temperatura de la etapa (b) es de o de aproximadamente -7 °C. En un modo de realización específico, el tampón de suspensión en la etapa (d) se ajusta con aproximadamente 600 ml de ácido acético glacial.

En determinados modos de realización, el diafiltrado tendrá una concentración de proteínas entre aproximadamente un 8 % y aproximadamente un 12 %, por ejemplo, aproximadamente un 8 %, o aproximadamente un 9 %, 10 %, 11 %, o 12 %. En un modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 10 %. En otro modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 11 %. Aún en otro modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 12 %. En otros modos de realización, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína entre aproximadamente un 13 % y aproximadamente un 17 %, por ejemplo, aproximadamente un 13 %, o aproximadamente un 14 %, 15 %, 16 %, o 17 %. Aún en otros modos de realización, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína entre aproximadamente un 18 % y aproximadamente un 22 %, por ejemplo, aproximadamente un 18 %, o aproximadamente un 19 %, 20 %, 21 %, o 22 %. En un modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 20 %. En otro modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 21 %. Aún en otro modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 22 %.

En determinados modos de realización de la presente invención, los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden comprender mejoras en dos o más de las etapas del procedimiento de fraccionamiento descritas anteriormente. Por ejemplo, los modos de realización pueden incluir mejoras en la etapa de precipitación, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada, y/o la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

En un modo de realización, la mejora realizada en la primera etapa de precipitación es la adición de alcohol por pulverización. En otro modo de realización, la mejora realizada en la primera etapa de precipitación es la adición de un agente modificador de pH por pulverización. Aún en otro modo de realización, la mejora realizada en la primera etapa de precipitación es el ajuste del pH de la solución después de la adición del alcohol. En un modo de realización relacionado, la mejora realizada en la primera etapa de precipitación es el mantenimiento del pH de la solución durante la adición del alcohol. En otro modo de realización relacionado, la mejora realizada en la primera etapa de precipitación es el mantenimiento del pH durante el tiempo de incubación de precipitación ajustando de forma continua el pH de la solución. En determinados modos de realización, la primera etapa de precipitación se puede mejorar implementando más de una de estas mejoras. Otras mejoras que se pueden producir en esta etapa serán evidentes a partir de la sección proporcionada a continuación que analiza la primera etapa de precipitación (Fraccionamiento I modificado). Al implementar una o más de las mejoras descritas anteriormente, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de precipitado de la primera etapa de precipitación y/o se desnaturaliza de forma irreversible una fracción reducida de IgG durante la etapa de precipitación.

- En un modo de realización, la mejora realizada en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada es la adición de alcohol por pulverización. En otro modo de realización, la mejora realizada en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada es la adición de un agente modificador de pH por pulverización. Aún en otro modo de realización, la mejora realizada en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada es el ajuste del pH de la solución después de la adición del alcohol. En un modo de realización relacionado, la mejora realizada en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada es el mantenimiento del pH de la solución durante la adición del alcohol. En otro modo de realización relacionado, la mejora realizada en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada es el mantenimiento del pH durante el tiempo de incubación de precipitación ajustando de forma continua el pH de la solución. En otro aspecto, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada se mejora incrementando la concentración de alcohol hasta un o aproximadamente un 25 %. Aún en otro modo de realización, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada se mejora disminuyendo la temperatura de incubación hasta entre aproximadamente -7 °C y -9 °C. En determinados modos de realización, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada se puede mejorar implementando más de una de estas mejoras. Otras mejoras que se pueden producir en esta etapa serán evidentes a partir de la sección proporcionada a continuación que analiza la segunda etapa de precipitación (Fraccionamiento II+III modificado). Al implementar una o más de las mejoras descritas anteriormente, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción sobrenadante de la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada y/o se desnaturaliza de forma irreversible una fracción reducida de IgG durante la etapa de precipitación.
- En un modo de realización, la mejora realizada en la etapa de disolución de la fracción II+III modificada se logra incrementando el contenido en ácido acético glacial del tampón de disolución hasta aproximadamente un 0,06 %. En otro modo de realización, la mejora realizada en la etapa de disolución de la fracción II+III modificada se logra manteniendo el pH de la solución durante el tiempo de incubación de disolución ajustando de forma continua el pH de la solución. En otro modo de realización, la mejora realizada en la etapa de disolución de la fracción II+III modificada se logra mezclando dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la fracción II+III antes de la filtración. En determinados modos de realización, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada se puede mejorar implementando más de una de estas mejoras. Otras mejoras que se pueden producir en esta etapa serán evidentes a partir de la sección proporcionada a continuación que analiza la etapa de disolución de la fracción II+III modificada (Extracción del precipitado de la fracción II+III modificada). Al implementar una o más de las mejoras descritas anteriormente, se recupera una cantidad incrementada de IgG en la suspensión de la fracción II+III y/o se reduce la cantidad de impurezas en la suspensión de la fracción II+III.
- Una mejora de ejemplo realizada en la etapa de filtración de la suspensión de la fracción II+III modificada se produce lavando posteriormente el filtro con al menos aproximadamente 3,6 volúmenes muertos de un tampón de disolución que contiene o que contiene aproximadamente 150 ml de ácido acético glacial por 1000 l. Otras mejoras que se pueden producir en esta etapa serán evidentes a partir de la sección proporcionada a continuación que analiza la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada (Pretratamiento y filtración de la suspensión de la fracción II+III modificada). Al implementar una o más de las mejoras descritas anteriormente, se pierde una cantidad reducida de IgG durante la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.
- En un modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación y la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada.
- En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación y la etapa de disolución de la fracción II+III modificada.
- En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.
- En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada y la etapa de disolución de la fracción II+III modificada.
- En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.
- En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada y la etapa de disolución de la fracción II+III modificada.
- En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.
- En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

- 5 En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la totalidad de la primera etapa de precipitación, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

10 En determinados modos de realización, una mejora del procedimiento en los procedimientos de purificación de IgG proporcionados en el presente documento comprende la adición por pulverización de una o más soluciones que se introducirían de otro modo en una fracción de plasma por adición de fluyente. Por ejemplo, en determinados modos de realización la mejora del procedimiento comprende la adición de alcohol (por ejemplo, etanol) en una fracción de plasma para los propósitos de precipitación de una o más especies de proteínas por pulverización. En otros modos de realización, las soluciones que se pueden añadir a una fracción de plasma por pulverización incluyen, sin limitación, una solución modificadora de pH, una solución de disolvente, una solución de detergente, un tampón de dilución, una solución modificadora de conductividad, y similares. En un modo de realización preferente, se realizan una o más etapas de precipitación por la adición de alcohol a una fracción de plasma por pulverización. En un segundo modo de realización preferente, se realizan una o más etapas de ajuste de pH por la adición de una solución modificadora de pH a una fracción de plasma por pulverización.

20 En determinados modos de realización, otra mejora del procedimiento, que se pueden combinar con cualquier otra mejora del procedimiento, comprende el ajuste del pH de una fracción de plasma que se precipita después de y/o concomitante con la adición del agente de precipitación (por ejemplo, alcohol o polietilenglicol). En algunos modos de realización, se proporciona una mejora del procedimiento en la que el pH de una fracción de plasma que se precipita activamente se mantiene en toda la etapa completa de incubación de precipitación o retención por la monitorización continua y el ajuste del pH. En modos de realización preferentes, el ajuste del pH se realiza por la adición por pulverización de una solución modificadora de pH.

25 En otros modos de realización, otra mejora del procedimiento, que se puede combinar con cualquier otra mejora del procedimiento, comprende el uso de una etapa de tratamiento de sílice finamente dividido para retirar impurezas.

30 1. Preparación de plasma desprovisto de crioprecipitado

El material de partida usado para la preparación de composiciones de IgG concentradas consiste en general en plasma recuperado (es decir, plasma que se ha separado de sangre completa ex vivo) o bien plasma de fuente (es decir, plasma recogido por medio de plasmaféresis). Típicamente, el procedimiento de purificación comienza descongelando los plasmas combinados previamente congelados, lo que ya se ha sometido a ensayo para determinar las consideraciones de seguridad y calidad. Típicamente, se lleva a cabo la descongelación a una temperatura no mayor de 6 °C. Después de una descongelación completa del plasma congelado a baja temperatura, se realiza la centrifugación en frío (por ejemplo, ≤ 6 °C) para separar los crioprecipitados sólidos del sobrenadante líquido. De forma alternativa, se puede realizar la etapa de separación por filtración en vez de centrifugación. El sobrenadante líquido (también denominado "plasma desprovisto de crioprecipitado", después de que se retiren las proteínas insolubles en frío por centrifugación del plasma recién descongelado) se procesa a continuación en la siguiente etapa. Se pueden tomar varias etapas adicionales en este momento para el aislamiento de la actividad de derivación inhibidora del factor 40 ocho (FEIBA), complejo de factor IX, concentrado de factor VII, o complejo de antitrombina III.

45 2. Primer acontecimiento de precipitación - Fraccionamiento I modificado

En esta etapa, típicamente, se enfría el plasma desprovisto de crioprecipitado hasta aproximadamente 0 ± 1 °C y se ajusta el pH hasta entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5, preferentemente entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,3, lo más preferentemente a aproximadamente 7,2. En un modo de realización, se ajusta el pH del plasma desprovisto de crioprecipitado hasta un pH de o de aproximadamente 7,2. A continuación, se añade el etanol preenfriado mientras que se agita el plasma hasta una concentración objetivo de etanol a un o aproximadamente a un 8 % v/v. Al mismo tiempo, se reduce adicionalmente la temperatura hasta entre aproximadamente -4 y 50 aproximadamente 0 °C. En un modo de realización preferente, se reduce la temperatura hasta o hasta aproximadamente -2 °C, para precipitar contaminantes tales como α_2 -macroglobulina, β_{1A} - y β_{1C} -globulina, fibrinógeno y Factor VIII. Típicamente, el acontecimiento de precipitación incluirá un tiempo de retención de al menos aproximadamente 1 hora, aunque también se pueden emplear tiempos de retención más cortos o más largos. Posteriormente, se recoge a continuación el sobrenadante (sobrenadante I), que contiene idealmente la totalidad del contenido en IgG presente en el plasma desprovisto de crioprecipitado, por centrifugación, filtración, u otro 60 procedimiento adecuado.

En comparación con procedimientos convencionales empleados como primera etapa de fraccionamiento para el plasma desprovisto de crioprecipitado (Cohn et al., supra; Oncley et al., supra), la presente invención proporciona, 65 en diversos modos de realización, procedimientos que dan como resultado una mejora en los rendimientos de IgG en la fracción I de sobrenadante. En un modo de realización, la mejora en el rendimiento de IgG se logra añadiendo el

alcohol por pulverización. En otro modo de realización, la mejora en el rendimiento de IgG se logra añadiendo un agente modificador de pH por pulverización. Aún en otro modo de realización, la mejora en el rendimiento de IgG se logra ajustando el pH de la solución después de la adición del alcohol. En un modo de realización relacionado, la mejora en el rendimiento de IgG se logra ajustando el pH de la solución durante la adición del alcohol.

En un aspecto específico, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de precipitado de la primera etapa de precipitación. Por ejemplo, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de precipitado de la primera etapa de precipitación en comparación con la cantidad de IgG perdida en la primera etapa de precipitación del protocolo del procedimiento 6 de Cohn.

En determinados modos de realización, la mejora del procedimiento se produce ajustando el pH de la solución hasta entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 después de la adición del alcohol en precipitación. En otros modos de realización, se ajusta el pH de la solución hasta entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,3 después de la adición del alcohol en precipitación. Aún en otros modos de realización, se ajusta el pH de la solución hasta aproximadamente 7,0 o aproximadamente 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, o 7,5 después de la adición del alcohol en precipitación. En un modo de realización particular, se ajusta el pH de la solución hasta aproximadamente 7,2 después de la adición del alcohol en precipitación. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de precipitado de la primera etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se ajusta el pH de la solución antes pero no después de la adición del alcohol en precipitación. En un modo de realización, se mantiene el pH al pH deseado durante el tiempo de retención o de incubación de la precipitación ajustando de forma continua el pH de la solución. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

En otros modos de realización determinados, la mejora del procedimiento se produce añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de precipitado de la primera etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se introduce el alcohol y/o solución usados para ajustar el pH por adición de fluyente. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

Aún en otros modos de realización determinados, la mejora se produce ajustando el pH de la solución hasta entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5. En un modo de realización preferente, se ajusta el pH de la solución hasta entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,3. En otros modos de realización, se ajusta el pH de la solución hasta o aproximadamente hasta 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, o 7,5 después de la adición del alcohol en precipitación y añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. En un modo de realización particular, se ajusta el pH de la solución hasta o hasta aproximadamente 7,2 después de la adición del alcohol en precipitación y añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

3. Segundo acontecimiento de precipitación - Fraccionamiento II+III modificado

Para enriquecer adicionalmente el contenido en IgG y la pureza del fraccionamiento, se somete el sobrenadante I a una segunda etapa de precipitación, que es un fraccionamiento de la fracción II+III de Cohn-Oncley modificado. En general, se ajusta el pH de la solución hasta un pH de entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 6,8. En un modo de realización preferente, se ajusta el pH de la solución hasta o aproximadamente hasta 6,7. A continuación, se añade alcohol, preferentemente etanol, a la solución mientras que se agita hasta una concentración final de entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 25 % (v/v) para precipitar la IgG en la fracción. En un modo de realización preferente, se añade alcohol hasta una concentración final de un o aproximadamente de un 25 % (v/v) para precipitar la IgG en la fracción. En general, los contaminantes tales como α_1 -lipoproteína, α_1 -antitripsina, Gc-globulinas, α_{1x} -glucoproteína, haptoglobulina, ceruloplasmina, transferrina, hemopexina, una fracción del factor de Christmas, globulina de unión a tiroxina, colinesterasa, hipertensinógeno, y albúmina no se precipitarán por estas condiciones.

Antes de o concomitante con la adición de alcohol, se enfría adicionalmente la solución hasta entre aproximadamente -7 °C y aproximadamente -9 °C. En un modo de realización preferente, se enfría la solución hasta una temperatura de o de aproximadamente -7 °C. Después de la finalización de la adición de alcohol, se ajusta de inmediato el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,0. En un modo de realización preferente, se ajusta el pH de la solución hasta o hasta aproximadamente 6,9. Típicamente, el acontecimiento de precipitación incluirá un tiempo de retención de al menos aproximadamente 10 horas, aunque también se pueden emplear tiempos de retención más cortos o más largos. Posteriormente, el precipitado (Fracción II+III modificada), que contiene idealmente al menos aproximadamente un 85 %, preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 95 %, del contenido en IgG presente en el plasma desprovisto de crioprecipitado, se separa del sobrenadante por centrifugación, filtración, u otro procedimiento adecuado y se recoge. En comparación con procedimientos convencionales empleados como segunda etapa de fraccionamiento para el plasma desprovisto de crioprecipitado (Cohn et al., supra; Oncley et al., supra), la presente invención proporciona, en diversos modos de realización, procedimientos que dan como resultado una mejora en los rendimientos de IgG en el precipitado de la fracción II+III modificada. En un modo de realización relacionado, la presente invención proporciona procedimientos que dan como resultado una pérdida reducida de IgG en el sobrenadante de II+III modificada.

En comparación con procedimientos convencionales empleados como segunda etapa de fraccionamiento para el plasma desprovisto de crioprecipitado (Cohn et al., supra; Oncley et al., supra), la presente invención proporciona, en diversos modos de realización, procedimientos que dan como resultado una mejora en los rendimientos de IgG en el precipitado de la fracción II+III modificada. En un modo de realización, la mejora se produce por la adición de alcohol por pulverización. En otro modo de realización, la mejora se produce por la adición de un agente modificador de pH por pulverización. En otro modo de realización, la mejora se produce ajustando el pH de la solución después de la adición del alcohol. En un modo de realización relacionado, la mejora se produce ajustando el pH de la solución durante la adición del alcohol. En otro modo de realización, la mejora se produce incrementando concentración de alcohol (por ejemplo, etanol) hasta aproximadamente un 25 % (v/v). En otro modo de realización, la mejora se produce disminuyendo la temperatura de la etapa de precipitación hasta entre aproximadamente -7 °C y -9 °C. En un modo de realización preferente, la mejora se produce incrementando la concentración de alcohol (por ejemplo, etanol) hasta aproximadamente un 25 % (v/v) y disminuyendo la temperatura hasta entre aproximadamente -7 °C y -9 °C. En comparación, tanto Cohn et al. como Oncley et al. realizan la precipitación a -5 °C y Oncley et al. usan alcohol al 20 %, para reducir el nivel de contaminantes en el precipitado. De forma ventajosa, los procedimientos proporcionados en el presente documento permiten un rendimiento máximo de IgG sin niveles altos de contaminación en el producto final.

Se ha descubierto que cuando se ajusta el pH de la solución hasta un pH de aproximadamente 6,9 antes de la adición del alcohol en precipitación, el pH de la solución se desplaza de 6,9 a entre aproximadamente 7,4 y aproximadamente 7,7, debido en parte a la precipitación de proteína (véase la figura 8). A medida que el pH de la solución se aleja de 6,9, la precipitación de IgG se vuelve menos favorable y la precipitación de determinados contaminantes se vuelve más favorable. De forma ventajosa, los inventores han descubierto que ajustando el pH de la solución después de la adición del alcohol en precipitación, se recupera un mayor porcentaje de IgG en el precipitado de la fracción II+III.

En consecuencia, en un aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada. En otras palabras, un incremento en el porcentaje de la IgG de partida está presente en el precipitado de la fracción II+III. En determinados modos de realización, la mejora del procedimiento se produce ajustando el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,1 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce manteniendo el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,1 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación. En otros modos de realización, se ajusta el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,0 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación, o hasta un pH de aproximadamente 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, o 7,1 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En un modo de realización particular, se ajusta el pH de la solución hasta aproximadamente 6,9 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En determinados modos de realización, se mantiene el pH de la solución a entre aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,0 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación, o a un pH de aproximadamente 6,9 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la segunda etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se ajusta el pH de la solución antes pero no después de la adición del alcohol en precipitación o con una etapa de precipitación análoga en la que no se mantiene el pH de la solución durante la totalidad del periodo de incubación de precipitación. En un modo de realización, se mantiene el pH al pH deseado durante el tiempo de retención o de incubación de la precipitación ajustando de forma continua el pH de la solución. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la segunda etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se introduce el alcohol y/o solución usados para ajustar el pH por adición de fluyente. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce realizando la etapa de precipitación a una temperatura entre aproximadamente -7 °C y aproximadamente -9 °C. En un modo de realización, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o de aproximadamente -7 °C. En otro modo de realización, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o de aproximadamente -8 °C. En otro modo de realización, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o de aproximadamente -9 °C. En determinados modos de realización, la concentración de alcohol de la etapa de precipitación está entre aproximadamente un 23 % y aproximadamente un 27 %. En un modo de realización preferente, la concentración de alcohol está entre aproximadamente un 24 % y aproximadamente un 26 %. En otro modo de realización preferente, la concentración de alcohol es de un o aproximadamente de un 25 %. En otros modos de realización, la concentración de alcohol puede estar en un o aproximadamente en un 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, o 27 %. En un modo de realización particular, la segunda etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o de aproximadamente -7 °C con una concentración de alcohol de o de aproximadamente un 25 %. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

El efecto del incremento de la concentración de alcohol de la segunda precipitación de un 20 %, usado en Oncley et al., supra, a un 25 % y la disminución de la temperatura de la incubación de -5 °C, usado en los procedimientos de Cohn y

Oncley, a o aproximadamente a -7 °C es un incremento de un 5 % a un 6 % en el contenido de IgG del precipitado de la fracción II+III modificado.

En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce ajustando el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,1, preferentemente a o aproximadamente a 6,9, inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación, manteniendo el pH de la solución a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,1, preferentemente a o aproximadamente a 6,9, ajustando de forma continua el pH durante el periodo de incubación de precipitación, y añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. En otro modo de realización particular, la mejora del procedimiento se produce realizando la etapa de precipitación a una temperatura entre aproximadamente -7 °C y aproximadamente -9 °C, preferentemente a o aproximadamente a -7 °C y precipitando la IgG con una concentración de alcohol de entre aproximadamente un 23 % y aproximadamente un 27 %, preferentemente a un o aproximadamente a un 25 %. Aún en otro modo de realización particular, la mejora del procedimiento se produce incorporando todas las mejoras de la fracción II+III modificada proporcionadas anteriormente. En un modo de realización preferente, la mejora del procedimiento se produce precipitando IgG a una temperatura de o aproximadamente de -7 °C con etanol a un o aproximadamente a un 25 % añadido por pulverización y a continuación ajustando el pH de la solución hasta o aproximadamente hasta 6,9 después de la adición del alcohol en precipitación. Aún en otro modo de realización preferente, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente a 6,9 durante la totalidad del periodo de incubación o de retención de precipitación.

4. Extracción del precipitado de la fracción II+III modificada

Para solubilizar el contenido en IgG del precipitado de la fracción II+III modificada, se usa un tampón de extracción en frío para resuspender el precipitado del fraccionamiento II+III en una proporción típica de 1 parte de precipitado con respecto a 15 partes del tampón de extracción. Se pueden usar otras proporciones de resuspensión adecuadas, por ejemplo de aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:30, o de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:20, o de aproximadamente 1:12 a aproximadamente 1:18, o de aproximadamente 1:13 a aproximadamente 1:17, o de aproximadamente 1:14 a aproximadamente 1:16. En determinados modos de realización, la proporción de resuspensión puede ser de aproximadamente 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, o mayor.

En general, las soluciones adecuadas para la extracción del precipitado II+III modificado tendrán un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,5. En determinados modos de realización, la solución tendrá un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,0, en otros modos de realización, la solución de extracción tendrá un pH de aproximadamente 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 o 5,5. En un modo de realización preferente, el pH del tampón de extracción será de o aproximadamente de 4,5. En otro modo de realización preferente, el pH del tampón de extracción será de o aproximadamente de 4,7. En otro modo de realización preferente, el pH del tampón de extracción será de o aproximadamente de 4,9. En general, estos requisitos de pH se pueden cumplir usando un agente de tamponación seleccionado de, por ejemplo, acetato, citrato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, mezclas de los mismos, y similares. Típicamente, las concentraciones de tampón adecuadas varían de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM, o de agente tamponador aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mM.

Preferentemente, el tampón de extracción tendrá una conductividad de desde aproximadamente 0,5 mS·cm⁻¹ a aproximadamente 2,0 mS·cm⁻¹. Por ejemplo, en determinados modos de realización, la conductividad del tampón de extracción será de aproximadamente 0,5 mS·cm⁻¹, o aproximadamente 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, o aproximadamente 2,0 mS·cm⁻¹. Un experto en la técnica sabrá cómo generar tampones de extracción que tengan una conductividad apropiada.

En un modo de realización particular, un tampón de extracción de ejemplo puede contener fosfato de sodio monobásico 5 mM o aproximadamente 5 mM y acetato 5 mM o aproximadamente 5 mM a un pH de o aproximadamente de 4,5 ± 0,2 y conductividad de o aproximadamente de 0,7 a 0,9 mS/cm.

En general, la extracción se realiza a entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 10 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C. En determinados modos de realización, la extracción se puede realizar a aproximadamente 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, o 10 °C. En un modo de realización particular, la extracción se realiza a entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 10 °C. Típicamente, el procedimiento de extracción proseguirá durante entre aproximadamente 60 y aproximadamente 300 minutos, o durante entre aproximadamente 120 y 240 min, o durante entre aproximadamente 150 y 210 minutos, mientras que se agita de forma continua la suspensión. En determinados modos de realización, el procedimiento de extracción proseguirá durante aproximadamente 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, o aproximadamente 300 minutos. En un modo de realización preferente, el procedimiento de extracción proseguirá durante al menos 160 minutos con agitación continua.

Se ha descubierto que empleando un tampón de extracción que contiene fosfato de sodio monobásico 5 mM, acetato 5 mM, y ácido acético glacial de un 0,051 % a un 0,06 % (v/v), se puede obtener un incremento sustancial en el

incremento del rendimiento en la composición de IgG final sin poner en peligro la pureza del producto final. La correlación de la cantidad de ácido acético y el pH del tampón de extracción se demuestra en la figura 9. En un modo de realización preferente, se extrae el precipitado de la fracción II+III con una proporción de pasta con respecto a tampón de o aproximadamente de 1:15 a un pH de o aproximadamente de $4,5 \pm 0,2$.

De forma ventajosa, se ha descubierto que en comparación con el procedimiento de fabricación actual para GAMMAGARD® LIQUID (Baxter Healthcare), que emplea un tampón de extracción que contiene fosfato de sodio monobásico 5 mM, acetato 5 mM, y ácido acético glacial al 0,051 % (v/v), que incrementando el contenido en ácido acético glacial hasta un o aproximadamente hasta un 0,06 % (v/v), se puede obtener un incremento sustancial en el incremento del rendimiento en la composición de IgG final. En comparación con procedimientos empleados previamente para la extracción del precipitado formado por la segunda etapa de precipitación (GAMMAGARD® LIQUID), la presente invención proporciona, en varios modos de realización, procedimientos que dan como resultado rendimientos de IgG mejorados en la suspensión de la fracción II+III modificada.

En un aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción no solubilizada del precipitado de la fracción II+III modificada. En un modo de realización, la mejora del procedimiento se produce extrayendo el precipitado de la fracción II+III modificada en una proporción de 1:15 (precipitado con respecto al tampón) con una solución que contiene fosfato de sodio monobásico 5 mM, acetato 5 mM, y ácido acético glacial al 0,06 % (v/v). En otro modo de realización, la mejora se produce manteniendo el pH de la solución durante la duración del procedimiento de extracción. En un modo de realización, el pH de la solución se mantiene a entre aproximadamente 4,1 y aproximadamente 4,9 durante la duración del procedimiento de extracción. En un modo de realización preferente, el pH de la solución se mantiene a entre aproximadamente 4,2 y aproximadamente 4,8 durante la duración del procedimiento de extracción. En un modo de realización más preferente, el pH de la solución se mantiene a entre aproximadamente 4,3 y aproximadamente 4,7 durante la duración del procedimiento de extracción. En otro modo de realización preferente, el pH de la solución se mantiene a entre aproximadamente 4,4 y aproximadamente 4,6 durante la duración del procedimiento de extracción. Aún en otro modo de realización preferente, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente a 4,5 durante la duración del procedimiento de extracción.

En otro aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se solubiliza una cantidad incrementada de IgG del precipitado de la fracción II+III en la etapa de disolución de la fracción II+III. En un modo de realización, la mejora del procedimiento se produce solubilizando el precipitado de la fracción II+III en un tampón de disolución que contiene 600 ml de ácido acético glacial por 1000 l. En otro modo de realización, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se reducen las impurezas después de que se solubiliza la IgG en el precipitado de la fracción II+III. En un modo de realización, la mejora del procedimiento se produce mezclando dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la fracción II+III durante al menos aproximadamente 30 minutos.

5. Pretratamiento y filtración de la suspensión de la fracción II+III modificada

Para retirar la fracción no solubilizada del precipitado de la fracción II+III modificada (es decir, la torta de filtro de la fracción II+III modificada), se filtra la suspensión, típicamente usando filtración de profundidad. Los filtros de profundidad que se pueden emplear en los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen, filtros de profundidad metálicos, de vidrio, cerámicos, orgánicos (tales como tierra de diatomeas) y similares. Ejemplos de filtros adecuados incluyen, sin limitación, filtros Cuno 50SA, Cuno 90SA, y Cuno VR06 (Cuno). De forma alternativa, la etapa de separación se puede realizar por centrifugación en vez de filtración.

Aunque las mejoras en el procedimiento de fabricación descritas anteriormente minimizan las pérdidas de IgG en las etapas iniciales del procedimiento de purificación, impurezas críticas, incluyendo actividad de PKA, actividad amidolítica, y contenido en fibrinógeno, son mucho mayores cuando, por ejemplo, se extrae la pasta II+III a pH 4,5 o 4,6, en comparación a cuando se produce la extracción a un pH alrededor de 4,9 a 5,0 (véanse, los ejemplos 2 a 5).

Para contrarrestar las impurezas extraídas en los procedimientos proporcionados en el presente documento, se ha descubierto que la pureza de la composición de IgG se puede potenciar considerablemente por la adición de una etapa de pretratamiento anterior a la filtración/centrifugación. En un modo de realización, esta etapa de pretratamiento comprende la adición de partículas de dióxido de sílice finamente dividido (por ejemplo, sílice de combustión, Aerosil®) seguido de un periodo de incubación de 40 a 80 minutos durante el que se mezcla de forma constante la suspensión. En determinados modos de realización, el periodo de incubación estará entre aproximadamente 50 minutos y aproximadamente 70 minutos, o aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o más minutos. En general, el tratamiento se realizará a entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 10 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C. En determinados modos de realización, el tratamiento se puede realizar a aproximadamente 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, o 10 °C. En un modo de realización particular, el tratamiento se realiza a entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 10 °C.

El efecto del tratamiento con sílice de combustión se ejemplifica por los resultados hallados en el ejemplo 17. En este ejemplo, se suspende un precipitado de la fracción II+III y se divide en dos muestras, de las que una se aclara con coadyuvante de filtro solo antes de la filtración (figura 7A) y de las que una se trata con sílice de combustión antes de

la adición del coadyuvante de filtro y la filtración (figura 7B). Como se puede observar en las cromatografías y en los datos cuantificados, la muestra de filtrado pretratada con sílice de combustión tenía una pureza de IgG mucho mayor que la muestra tratada solo con coadyuvante de filtro (68,8 % frente al 55,7 %; comparar las tablas 17 y 18, respectivamente).

En determinados modos de realización, se añade sílice de combustión a una concentración de entre aproximadamente 20 g/kg pasta II+III y aproximadamente 100 g/kg pasta II+III (es decir, para un precipitado de la fracción II+III modificada que se extrae en una proporción de 1:15, se debe añadir sílice de combustión a una concentración de aproximadamente 20 g/16 kg suspensión II+III a aproximadamente 100 g/16 kg suspensión II+III, o a una concentración final de aproximadamente un 0,125 % (p/p) a aproximadamente 0,625 % (p/p)). En determinados modos de realización, se puede añadir el sílice de combustión a una concentración de aproximadamente 20 g/kg pasta II+III, o aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 g/kg pasta II+III. En un modo de realización específico, se añade sílice de combustión (por ejemplo, Aerosil 380 o equivalente) a la suspensión de la fracción II+III modificada hasta una concentración final de aproximadamente 40 g/16 kg/kg II+III. La mezcla tiene lugar aproximadamente a de 2 a 8 °C durante al menos de 50 a 70 minutos.

En determinados modos de realización, se añadirá coadyuvante de filtro, por ejemplo Celpure C300 (Celpure) o Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), después del tratamiento con dióxido de sílice, para facilitar la filtración en profundidad. Se puede añadir coadyuvante de filtro a una concentración final de desde aproximadamente 0,1 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,07 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,2 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,06 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,3 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,05 kg/kg pasta II+III. En determinados modos de realización, se añadirá el coadyuvante de filtro a una concentración final de aproximadamente 0,1 kg/kg II+III pasta, o aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7 kg/kg II+III pasta.

Se perdió una fracción significativa de IgG durante la etapa de filtración del procedimiento de fabricación GAMMAGARD® LIQUID. Se descubrió que los procedimientos actuales de lavado post-filtración, usando 1,8 volúmenes muertos de tampón de suspensión para purgar los bastidores y líneas del filtro-prensa, eran insuficientes para una recuperación máxima de la IgG en esta etapa. De manera sorprendente, se descubrió que se requirieron al menos 3,0 volúmenes muertos, preferentemente 3,6 volúmenes muertos, del tampón de suspensión para la recuperación eficaz de IgG total en la suspensión aclarada de la fracción II+III modificada (véase, ejemplo 12 y figura 1). En determinados modos de realización, se puede lavar el filtro-prensa con cualquier tampón de suspensión adecuado. En un modo de realización particular, el tampón de lavado comprenderá, por ejemplo, fosfato de sodio monobásico 5 mM, acetato 5 mM, y ácido acético glacial al 0,015 % (v/v).

En un aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG durante la etapa de filtración de la suspensión de la fracción II+III. En un modo de realización, la mejora del procedimiento se produce sometiendo a postlavado el filtro con al menos aproximadamente 3,6 volúmenes muertos de tampón de disolución que contiene 150 ml de ácido acético glacial por 1000 l. La relación entre la cantidad de ácido acético glacial y el pH en el tampón de postlavado se muestra en la figura 10. En un modo de realización, el pH del tampón de extracción postlavado está entre aproximadamente 4,6 y aproximadamente 5,3. En un modo de realización preferente, el pH del tampón postlavado está entre aproximadamente 4,7 y aproximadamente 5,2. En otro modo de realización preferente, el pH del tampón postlavado está entre aproximadamente 4,8 y aproximadamente 5,1. Aún en otro modo de realización preferente, el pH del tampón postlavado está entre aproximadamente 4,9 y aproximadamente 5,0.

En comparación con los procedimientos empleados previamente para el aclarado de la suspensión formada a partir de la segunda etapa de precipitación (GAMMAGARD® LIQUID), la presente invención proporciona, en varios modos de realización, procedimientos que dan como resultado una mejora en los rendimientos de IgG y la pureza en la suspensión de fracción II+III aclarada. En un aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG en la torta de filtro de la fracción II+III modificada. En otro aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se encuentra una cantidad reducida de una impureza en la suspensión de la fracción II+III aclarada.

En un modo de realización, las mejoras del procedimiento se producen por la inclusión de un tratamiento de sílice de combustión anterior a la filtración o aclarado por centrifuga de una suspensión de la fracción II+III modificada. En determinados modos de realización, el tratamiento de sílice de combustión incluirá la adición de desde aproximadamente 0,1 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,07 kg/kg pasta II+III, o de aproximadamente 0,2 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,06 kg/kg pasta II+III, o de aproximadamente 0,3 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,05 kg/kg pasta II+III, o aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7 kg/kg pasta II+III, y se incubará la mezcla durante entre aproximadamente 50 minutos y aproximadamente 70 minutos, o aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o más minutos a una temperatura de entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C. En otro modo de realización, las mejoras del procedimiento se producen por inclusión de un tratamiento con sílice de combustión que redujo los niveles de fibrinógeno residual, actividad amidolítica, y/o actividad del activador de precalicreína.

En otro modo de realización, las mejoras del procedimiento se producen lavando el filtro de profundidad con entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 volúmenes del volumen muerto del filtro después de completar la etapa de

filtración de la suspensión de la fracción II+III modificada. En determinados modos de realización, se lavará el filtro con entre aproximadamente 3,5 volúmenes y aproximadamente 4,5 volúmenes, o al menos aproximadamente 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0 volúmenes del volumen muerto del filtro. En un modo de realización particular, se lavará el filtro-prensa con al menos

6. Tratamiento con detergente

Para retirar los contaminantes adicionales del filtrado de la fracción II+III modificada, a continuación se somete la muestra a un tratamiento con detergente. Los procedimientos para el tratamiento con detergente de fracciones derivadas de plasma son bien conocidos en la técnica. En general, se puede usar cualquier tratamiento con detergente no iónico estándar junto con los procedimientos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, a continuación se proporciona un protocolo de ejemplo para un tratamiento con detergente.

En resumen, se añade polisorbato-80 al filtrado de la fracción II+III modificada a una concentración final de aproximadamente un 0,2 % (p/v) con agitación y se incuba la muestra durante al menos 30 minutos a una temperatura entre aproximadamente 2 a 8 °C. A continuación, se mezcla el citrato de sodio deshidratado en la solución a una concentración final de aproximadamente 8 g/l y se incuba la muestra durante 30 minutos adicionales, con agitación continua a una temperatura de entre aproximadamente 2 a 8 °C.

En determinados modos de realización, se puede usar cualquier detergente no iónico adecuado. Los ejemplos de detergentes no iónicos adecuados incluyen, sin limitación, octilglucósido, digitonina, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween-20 (es decir, polisorbato-20), Tween-80 (es decir, polisorbato-80), un poli(óxido de etileno) de alquilo, un detergente Brij, un poli(óxido de etileno) de alquilfenol, un poloxámero, octilglucósido, decilmaltósido, y similares.

En un modo de realización, una mejora del procedimiento se produce añadiendo los reactivos de detergente (por ejemplo, polisorbato-80 y citrato de sodio deshidratado) por pulverización en vez de por adición de fluyente. En otros modos de realización, los reactivos de detergente se pueden añadir como sólidos al filtrado de la fracción II+III modificada mientras se está mezclando la muestra para garantizar una rápida distribución de los aditivos. En determinados modos de realización, es preferente añadir reactivos sólidos rociando los sólidos sobre un área de superficie deslocalizada del filtrado de modo que no se produce una sobreconcentración local, tal como en la adición de fluyente.

7. Tercer acontecimiento de precipitación - Precipitación G

Para retirar varias proteínas pequeñas residuales, tal como albúmina y transferrina, se realiza una tercera precipitación a una concentración de alcohol al 25 %. En resumen, se ajusta el pH del filtrado II+III tratado con detergente hasta entre aproximadamente 6,8 y 7,2, preferentemente entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,1, lo más preferentemente aproximadamente 7,0 con una solución modificadora de pH adecuada (por ejemplo, hidróxido de sodio 1 M o ácido acético 1 M). A continuación, se añade alcohol frío a la solución hasta una concentración final de aproximadamente un 25 % (v/v) y se incuba la mezcla mientras se agita a entre aproximadamente -6 °C a aproximadamente -10 °C durante al menos 1 hora para formar un tercer precipitado (es decir, precipitado G). En un modo de realización, se incuba la mezcla durante al menos 2 horas, o al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o más horas. En un modo de realización preferente, se incuba la mezcla durante al menos 2 horas. En un modo de realización más preferente, se incuba la mezcla durante al menos 4 horas. En un modo de realización aún más preferente, se incuba la mezcla durante al menos 8 horas.

En un aspecto, una mejora del procedimiento se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la tercera etapa de precipitación. En determinados modos de realización, la mejora del procedimiento se produce ajustando el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce manteniendo el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación. En otros modos de realización, se ajusta el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,1 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación, o hasta un pH de aproximadamente 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, o 7,2 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En un modo de realización particular, se ajusta el pH de la solución hasta aproximadamente 7,0 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En determinados modos de realización, se mantiene el pH de la solución a entre aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación, o a un pH de aproximadamente 7,0 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la tercera etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se ajusta el pH de la solución antes pero no después de la adición del alcohol en precipitación o con una etapa de precipitación análoga en la que no se mantiene el pH de la solución durante la totalidad del periodo de incubación de precipitación. En un modo de

realización, se mantiene el pH al pH deseado durante el tiempo de retención o de incubación de la precipitación ajustando de forma continua el pH de la solución. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la tercera etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se introduce el alcohol y/o solución usados para ajustar el pH por adición de fluyente. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

8. Suspensión y filtración del precipitado G (PptG)

Para solubilizar el contenido en IgG del precipitado G, se usa un tampón de extracción frío para resuspender el PptG. En resumen, se disuelve el precipitado G 1 a 3,5 en agua para inyectables (WFI) a entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 8 °C para lograr un valor de AU₂₈₀₋₃₂₀ de entre aproximadamente 40 a 95. A continuación se ajusta el pH final de la solución, que se agita durante al menos 2 horas, hasta o aproximadamente hasta $5,2 \pm 0,2$. En un modo de realización, este ajuste de pH se realiza con ácido acético 1 M. Para incrementar la solubilidad de la IgG, se incrementa la conductividad de la suspensión hasta entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 6,0 mS/cm. En un modo de realización, se incrementa la conductividad por la adición de cloruro de sodio. A continuación, se filtra la solución de PptG suspendido con un filtro de profundidad adecuado que tiene un tamaño de poro nominal de entre aproximadamente 0,1 µm y aproximadamente 0,4 µm para retirar cualquier partícula no disuelta. En un modo de realización, el tamaño de poro nominal del filtro de profundidad es de aproximadamente 0,2 µm (por ejemplo, filtro Cuno VR06 o equivalente) para obtener un filtrado aclarado. En otro modo de realización, se filtra la solución de PptG suspendido para recuperar un sobrenadante aclarado. El postlavado del filtro se realiza usando una solución de cloruro de sodio con una conductividad de entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 6,0 mS/cm. Típicamente, las soluciones adecuadas para la extracción del precipitado G incluyen, WFI y tampones con conductividad baja. En un modo de realización, un tampón de conductividad baja tiene una conductividad menor de aproximadamente 10 mS/cm. En un modo de realización preferente, el tampón de conductividad baja tiene una conductividad menor de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 mS/cm. En un modo de realización preferente, el tampón de conductividad baja tiene una conductividad de menos de aproximadamente 6 mS/cm. En otro modo de realización preferente, el tampón de conductividad baja tiene una conductividad de menos de aproximadamente 4 mS/cm. En otro modo de realización preferente, el tampón de conductividad baja tiene una conductividad de menos de aproximadamente 2 mS/cm.

9. Tratamiento con disolvente-detergente

Para inactivar diversos contaminantes víricos que pueden estar presentes en productos derivados de plasma, a continuación se somete el filtrado de PptG aclarado a un tratamiento con disolvente-detergente (S/D). Los procedimientos para el tratamiento con detergente de fracciones derivadas de plasma son bien conocidos en la técnica (para revisión véase, Pelletier JP et al., Best Pract Res Clin Haematol. 2006;19(1):205-42). En general, se puede usar cualquier tratamiento S/D estándar junto con los procedimientos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, a continuación se proporciona un protocolo de ejemplo para un tratamiento S/D.

En resumen, se añaden Triton X-100, Tween-20, y fosfato de tri(n-butilo) (TNBP) al filtrado de PptG aclarado a concentraciones finales de aproximadamente un 1,0 %, 0,3 %, y 0,3 %, respectivamente. A continuación, se agita la mezcla a una temperatura de entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 25 °C durante al menos aproximadamente una hora.

En un modo de realización, una mejora del procedimiento se produce añadiendo los reactivos S/D (por ejemplo, Triton X-100, Tween-20, y TNBP) por pulverización en vez de por adición de fluyente. En otros modos de realización, se pueden añadir los reactivos de detergente como sólidos al filtrado de PptG aclarado, que se está mezclando para garantizar una rápida distribución de los componentes S/D. En determinados modos de realización, es preferente añadir reactivos sólidos rociando los sólidos sobre un área de superficie deslocalizada del filtrado de modo que no se produce una sobreconcentración local, tal como en la adición de fluyente.

10. Cromatografía de intercambio iónico

Para purificar y concentrar adicionalmente la IgG del filtrado de PptG tratado con S/D, se puede emplear la cromatografía de intercambio catiónico y/o intercambio aniónico. Los procedimientos para purificar y concentrar la IgG usando cromatografía de intercambio iónico son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.886.154 describe un procedimiento en el que se extrae un precipitado de la fracción II+III a pH bajo (entre aproximadamente 3,8 y 4,5), seguido de precipitación de IgG usando ácido caprílico, y finalmente la implementación de dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico. La patente de EE. UU. n.º 6.069.236 describe un esquema de purificación de IgG cromatográfico que no se basa en modo alguno en la precipitación de alcohol. La publicación PCT n.º WO 2005/073252 describe un procedimiento de purificación de IgG que implica la extracción de un precipitado de la fracción II+III, tratamiento con ácido caprílico, tratamiento con PEG, y una única etapa de cromatografía de intercambio aniónico. La patente de EE. UU. n.º 7.186.410 describe un procedimiento de purificación de IgG que implica la

extracción de un precipitado de la fracción I+II+III o bien la fracción II seguido de una única etapa de intercambio aniónico realizada a pH alcalino. La patente de EE. UU. n.º 7.553.938 describe un procedimiento que implica la extracción de un precipitado de la fracción I+II+III o bien la fracción II+III, tratamiento con caprilato, y una o bien dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico. La patente de EE. UU. n.º 6.093.324 describe un procedimiento de purificación que comprende el uso de una resina de intercambio aniónico macroporosa que se hace funcionar a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 6,6. La patente de EE. UU. n.º 6.835.379 describe un procedimiento de purificación que se basa en cromatografía de intercambio catiónico en ausencia de fraccionamiento de alcohol. Las divulgaciones de las publicaciones anteriores se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

En un modo de realización de los procedimientos de la presente invención, se puede someter el filtrado de PptG tratado con S/D tanto a cromatografía de intercambio catiónico como a cromatografía de intercambio aniónico. Por ejemplo, en un modo de realización, el filtrado de PptG tratado con S/D se pasa a través de una columna de intercambio catiónico, que une la IgG en la solución. A continuación, los reactivos S/D se pueden separar por lavado de la IgG absorbida, que posteriormente se separa por elución de la columna con un tampón de elución de pH alto que tiene un pH de entre aproximadamente 8,0 y 9,0. De esta forma, se puede usar la etapa de cromatografía de intercambio catiónico para retirar los reactivos S/D de la preparación, para concentrar la solución que contiene la IgG, o ambos. En determinados modos de realización, el tampón de elución de pH puede tener un pH de entre aproximadamente 8,2 y aproximadamente 8,8, o entre aproximadamente 8,4 y aproximadamente 8,6, o un pH de aproximadamente 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, o 9,0. En un modo de realización preferente, el pH del tampón de elución es aproximadamente de $8,5 \pm 0,1$.

En determinados modos de realización, el eluato de la columna de intercambio catiónico se puede ajustar hasta un pH menor, por ejemplo entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5, y diluirse con un tampón apropiado de modo que se reduzca la conductividad de la solución. En determinados modos de realización, el pH del eluato de intercambio catiónico se puede ajustar hasta un pH de entre aproximadamente 5,7 y aproximadamente 6,3, o entre aproximadamente 5,9 y aproximadamente 6,1, o un pH de aproximadamente 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, o 6,5. En un modo de realización preferente, el pH del eluato se ajusta hasta un pH de aproximadamente $6,0 \pm 0,1$. A continuación, se carga el eluato sobre una columna de intercambio aniónico, que une varios contaminantes descubiertos en la preparación. El flujo a través de la columna, que contiene la fracción de IgG, se recoge durante la carga y el lavado de la columna. En determinados modos de realización, las etapas cromatográficas de intercambio iónico de la presente invención se pueden realizar en modo de columna, en modo de lote, o en una combinación de los dos.

En determinados modos de realización, una mejora del procedimiento se produce añadiendo la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente.

11. Nanofiltración y ultra/diafiltración

Para reducir adicionalmente la carga vírica de la composición de IgG proporcionada en el presente documento, se puede nanofiltrar el efluente de la columna de intercambio aniónico usando un dispositivo de nanofiltración adecuado. En determinados modos de realización, el dispositivo de nanofiltración tendrá un tamaño de poro medio de entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 200 nm. Los ejemplos de nanofiltros adecuados para este uso incluyen, sin limitación, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N, y 75N (Planova). En un modo de realización específico, el nanofiltro puede tener un tamaño de poro medio de entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 72 nm, o entre aproximadamente 19 nm y aproximadamente 35 nm, o de aproximadamente 15 nm, 19 nm, 35 nm, o 72 nm. En un modo de realización preferente, el nanofiltro tendrá un tamaño de poro medio de aproximadamente 35 nm, tal como un filtro Asahi PLANOVA 35N o equivalente del mismo.

Opcionalmente, se puede realizar una ultrafiltración/diafiltración para concentrar adicionalmente el nanofiltrado. En un modo de realización, se usa una membrana de canal abierto con un postlavado específicamente diseñado y la formulación cerca del final del procedimiento de producción hace que las composiciones de IgG resultantes tengan una concentración de proteína aproximadamente dos veces mayor (200 mg/ml) en comparación con las IVIG del estado de la técnica (por ejemplo, GAMMAGARD® LIQUID) sin afectar al rendimiento y a la estabilidad en almacenamiento. Con la mayoría de las membranas de ultrafiltración disponibles comercialmente no se puede alcanzar una concentración de 200 mg/ml de IgG sin pérdidas importantes de proteína. Estas membranas se bloquearán pronto y por tanto, es difícil lograr un postlavado adecuado. Por lo tanto, se deben usar configuraciones de membrana de canal abierto. Incluso con membranas de canal abierto, se debe usar un procedimiento de postlavado diseñado específicamente para obtener la concentración requerida sin una pérdida significativa de proteína (pérdida menor de un 2 %). Aún más sorprendente es el hecho de que la mayor concentración de proteína de 200 mg/ml no logra la capacidad de inactivación del virus de la etapa de almacenamiento a pH bajo.

Posterior a la nanofiltración, se puede concentrar adicionalmente el filtrado por ultrafiltración/diafiltración. En un modo de realización, se puede concentrar el nanofiltrado por ultrafiltración hasta una concentración de proteína de entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 10 % (p/v). En determinados modos de realización, la ultrafiltración se lleva a cabo en un casete con una pantalla de canal abierto y la membrana de ultrafiltración tiene un límite de peso

molecular nominal (NMWCO) menor de aproximadamente 100 kDa o menor de aproximadamente 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 kDa, o menos kDa. En un modo de realización preferente, la membrana de ultrafiltración tiene un nmWCO de no más de 50 kDa.

Tras la finalización de la etapa de ultrafiltración, se puede concentrar adicionalmente el concentrado por medio de diafiltración frente a una solución adecuada para su administración intravenosa o intramuscular. En determinados modos de realización, la solución de diafiltración puede comprender un agente estabilizante y/o tamponador. En un modo de realización preferente, el agente estabilizante y tamponador es glicina en una concentración apropiada, por ejemplo entre aproximadamente 0,20 M y aproximadamente 0,30 M, o entre aproximadamente 0,22 M y aproximadamente 0,28 M, o entre aproximadamente 0,24 M y aproximadamente 0,26 mM, o a una concentración de aproximadamente 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, o 3,0. En un modo de realización preferente, el tampón de diafiltración contiene glicina 0,25 M o aproximadamente 0,25 M.

Típicamente, el volumen de intercambio mínimo es al menos aproximadamente 3 veces el volumen de concentrado original o al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más veces el volumen de concentrado original. La solución de IgG se puede concentrar hasta una concentración de proteína de aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 25 % (p/v), o entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 18 % (p/v), o entre aproximadamente un 7 % y aproximadamente un 16 % (p/v), o entre aproximadamente un 8 % y aproximadamente un 14 % (p/v), o entre aproximadamente un 9 % y aproximadamente un 12 %, o hasta una concentración final de aproximadamente un 5 %, o un 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 % o mayor. En un modo de realización, se logra una concentración de proteína final de al menos aproximadamente un 23 % sin añadir la fracción de postlavado a la solución concentrada. En otro modo de realización, se logra una concentración de proteína final de al menos aproximadamente un 24 % sin añadir la fracción de postlavado a la solución concentrada. Se logra una concentración de proteína final de al menos aproximadamente un 25 % sin añadir la fracción de postlavado a la solución concentrada. Típicamente, al final del procedimiento de concentración, el pH de la solución estará entre aproximadamente 4,6 a 5,1.

En un modo de realización ejemplar, el pH de la composición de IgG se ajusta hasta aproximadamente 4,5 antes de la ultrafiltración. La solución se concentra hasta una concentración de proteína de un 5 ± 2 % p/v a través de ultrafiltración. La membrana UF tiene un límite de peso molecular nominal (NMWCO) de 50.000 Dalton o menos (membrana de poliéter-sulfona de Millipore Pellicon). El concentrado se somete a diafiltración frente a diez volúmenes de solución de glicina 0,25 M, pH $4,5 \pm 0,2$. En toda la operación de ultra-diafiltración, se mantiene la solución a una temperatura de entre aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C. Después de la diafiltración, se concentra la solución hasta una concentración de proteína de al menos un 11 % (p/v).

12. Formulación

Tras la finalización de la etapa de diafiltración, se ajusta la concentración de proteína de la solución con el tampón de diafiltración hasta una concentración final de entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 20 % (p/v), o entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 18 % (p/v), o entre aproximadamente un 7 % y aproximadamente un 16 % (p/v), o entre aproximadamente un 8 % y aproximadamente un 14 % (p/v), o entre aproximadamente un 9 % y aproximadamente un 12 %, o hasta una concentración final de aproximadamente un 5 %, o un 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 %. En un modo de realización preferente, la concentración de proteína final de la solución está entre aproximadamente un 9 % y aproximadamente un 11 %, más preferentemente es de aproximadamente un 10 %.

La solución en masa formulada se esteriliza adicionalmente filtrando a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro absoluto de no más de aproximadamente 0,22 micrómetros, por ejemplo aproximadamente 0,2 micrómetros. A continuación, la solución se dispensa asépticamente en recipientes finales para un sellado apropiado, con muestras tomadas para muestreo.

En un modo de realización, la composición de IgG se ajusta adicionalmente hasta una concentración de aproximadamente un $10,2 \pm 0,2$ % (p/v) con un tampón de diafiltración. El pH se ajusta hasta de aproximadamente 4,4 a aproximadamente 4,9 en caso necesario. Finalmente, la solución se filtra de forma estéril y se incuba durante tres semanas a o aproximadamente a 30 °C.

13. Adición de alcohol

De forma ventajosa, se ha descubierto que, con el fin de fraccionar la IgG de plasma, la adición de alcohol pulverizando en lugar de la adición de fluyente da como resultado una reducción en la pérdida de los rendimientos de IgG. Sin comprometerse con ninguna teoría, durante la adición de fluyente a una fracción de plasma, la sobreconcentración local transitoria de alcohol en el acceso de fluido puede dar lugar a una desnaturalización de las proteínas y a la pérdida irreversible y/o precipitación de IgG durante las etapas en las que la IgG debe permanecer en el sobrenadante. Además, estos efectos se pueden amplificar cuando se necesita añadir grandes volúmenes de alcohol, tal como el purificaciones a escala industrial que implican el fraccionamiento de al menos 100 l de plasmas combinados.

El efecto de la adición de alcohol por medio de pulverización se ejemplifica en el ejemplo 14, en el que se precipitan muestras de plasma desprovisto de crioprecipitado con etanol al 8 % introducido por adición de fluyente (1 y 2) o bien adición por pulverización (3 y 4). Como se puede observar en la tabla 14, casi el 100 % de la IgG presente en el plasma desprovisto de crioprecipitado se recupera en el sobrenadante cuando se añade etanol a la muestra por pulverización, mientras que de un 4 a un 5 % de la IgG se pierde tras la adición de fluyente de alcohol. Esto da como resultado una pérdida de IgG de entre aproximadamente 0,20 y 0,25 g/l en esta etapa sola. En términos de niveles de producción en 2007, esto se traduce en una pérdida de aproximadamente 5,3 millones de gramos (5.300 kilogramos) de IgG. Dado el precio de mercado actual para IVIG, que varía de entre 50 \$ y 100 \$ por gramo, una pérdida de un 4 a un 5 % en esta etapa representa una pérdida económica global de hasta quinientos millones de dólares anualmente.

En consecuencia, en un aspecto de los procedimientos proporcionados en el presente documento, se realizan una o más etapas de precipitación por la adición por pulverización de alcohol. En determinados modos de realización, se puede realizar la adición por pulverización por cualquier dispositivo presurizado, tal como un recipiente (por ejemplo, un frasco pulverizador), que tiene una cabeza de pulverización o una boquilla y se hace funcionar de forma manual o automática para generar una vaporización fina de un líquido. En determinados modos de realización, se realiza la adición por pulverización mientras el sistema se agita de forma continua o se mezcla de otro modo para garantizar una distribución rápida y equitativa del líquido dentro del sistema.

14. Ajuste del pH

El perfil de precipitación de proteínas de las fracciones de plasma es altamente dependiente del pH de la solución a partir de la que se precipitan las proteínas de plasma. Este hecho se ha explotado por los científicos que fraccionan proteínas de plasma desde la introducción de los procedimientos de Cohn y Oncley en 1946 y 1949, respectivamente. Tradicionalmente, el pH de una fracción de plasma se ajusta antes de la adición de alcohol para facilitar los mayores rendimientos de recuperación para el componente de interés. De forma ventajosa, ahora se ha descubierto que ajustando el pH de la solución directamente después de la adición de alcohol o concomitante con la adición de alcohol da como resultado una precipitación más definida y reproducible. Se descubrió que la adición de etanol a las fracciones de plasma da como resultado fluctuaciones en el pH de la solución, en general, elevando el pH de la solución. Como tal, al ajustar el pH de una fracción de plasma hasta un pH predeterminado antes pero no después de la adición de alcohol, la reacción de precipitación se producirá a un pH no óptimo.

Asimismo, la precipitación de proteínas de una fracción de plasma afectará al entorno electrostático y por tanto, alterará el pH de la solución. En consecuencia, a medida que se deja progresar un acontecimiento de precipitación, el pH de la solución comenzará a divergir del valor de pH predeterminado que permite la recuperación máxima de las especies de proteínas de interés. Esto es especialmente cierto para acontecimientos de precipitación en los que se va a precipitar una fracción grande de la proteína, acontecimientos de precipitación en los que se usa un alto contenido en alcohol, y acontecimientos de precipitación que requieren un periodo de incubación largo.

El efecto de ajustar el pH de una fracción de plasma se ejemplifica por los resultados halladas en el ejemplo 16. En este ejemplo, se precipitó IgG de dos muestras de una fracción de sobrenadante I después de adición por pulverización de alcohol. Se ajustó el pH de ambas muestras a 6,7 antes de la adición de alcohol y se reajustó a 6,9 después de la adición de alcohol pero antes de la etapa de incubación de precipitación de 10 horas. En la primera muestra (referencia), no se ajustó el pH durante la incubación de 10 horas, mientras que la muestra dos (ajuste continuo), se ajustó constantemente el pH a pH 6,9 durante la incubación de 10 horas. Como se puede observar en la tabla 16, después de la retirada del precipitado de la fracción II+III modificada de las muestras, el primer sobrenadante contenía 0,2 g IgG/l plasma, mientras que la segunda muestra, en la que se mantuvo constante el pH durante la incubación de precipitación, contenía solo 0,13 g IgG/l plasma. La reducción en la pérdida de 0,07 g IgG/l plasma en la segunda muestra representa, en términos de niveles de producción en 2007, una pérdida de aproximadamente 1,9 millones de gramos (1.900 kilogramos) de IgG. Dado el precio de mercado actual para IVIG, que varía de entre 50 \$ y 100 \$ por gramo, una pérdida de un 1,5 % en esta etapa representa una pérdida económica global de hasta 200 millones de dólares anualmente.

En consecuencia, en un aspecto de los procedimientos proporcionados en el presente documento, el pH de una fracción de plasma se ajusta directamente después de la adición de alcohol. En modos de realización relacionados, se puede ajustar el pH antes o después de la adición de alcohol, o durante y después de la adición de alcohol, o antes, durante y después de la adición de alcohol. En un modo de realización relacionado, el pH de una solución se ajusta continuamente durante uno o más incubaciones o acontecimientos de precipitación de alcohol. En determinados modos de realización, el pH de una solución se ajusta continuamente o se mantiene mientras el sistema se agita continuamente o se mezcla de otro modo para garantizar una distribución rápida y equitativa del agente modificador de pH dentro del sistema.

Similar al caso de la adición de alcohol de fluyente, ahora se ha descubierto que la adición de fluyente de volúmenes grandes de un agente modificador de pH puede provocar variaciones de pH local transitorias, lo que da como resultado una desnaturalización o precipitación de proteína no deseada. En consecuencia, en un modo de realización de los procedimientos proporcionados en el presente documento, se pueden introducir agentes modificadores de pH en una o más etapas de fraccionamiento de plasma por adición por pulverización. En otro modo de realización de los

procedimientos proporcionados en el presente documento, el pH de una etapa de fracción de plasma o precipitación se puede ajustar por adición por pulverización de un agente modificador de pH. En determinados modos de realización, se puede realizar la adición por pulverización por cualquier dispositivo presurizado, tal como un recipiente (por ejemplo, un frasco pulverizador), que tiene una cabeza de pulverización o una boquilla y se hace funcionar de forma manual o automática para generar una vaporización fina de un líquido. En determinados modos de realización, se realiza la adición por pulverización mientras el sistema se agita de forma continua o se mezcla de otro modo para garantizar una distribución rápida y equitativa del líquido dentro del sistema.

III. Composiciones de IgG concentradas

Se han descrito composiciones de IVIG que comprenden anticuerpo para el tratamiento de determinadas afecciones autoinmunitarias. (Véase, por ejemplo, las publicaciones de patente de los EE. UU. n.º US 2002/0114802, US 2003/0099635 y US 2002/0098182.) Las composiciones de IVIG divulgadas en estas referencias incluyen anticuerpos policlonales.

1. Composiciones de IgG acuosas

En un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones de IgG acuosas preparadas por los procedimientos proporcionados en el presente documento. En general, las composiciones de IgG preparadas por los procedimientos novedosos descritos en el presente documento tendrán un contenido en IgG y pureza altos. Por ejemplo, las composiciones de IgG proporcionadas en el presente documento pueden tener una concentración de proteína de al menos aproximadamente un 3 % (p/v) y un contenido en IgG de pureza mayor de aproximadamente un 90 %. Estas composiciones de IgG de pureza alta son adecuadas para administración terapéutica, por ejemplo, para tratamiento con IVIG. En un modo de realización, la concentración de IgG es aproximadamente de un 10 % y se usa para administración intravenosa. En otro modo de realización, la concentración es aproximadamente de un 20 % y se usa para administración subcutánea o intramuscular.

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición de IgG acuosa preparada por un procedimiento que comprende las etapas de (a) precipitar una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado, en una primera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 10 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para obtener un sobrenadante enriquecido en IgG, (b) precipitar IgG del sobrenadante con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 30 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un primer precipitado, (c) resuspender el primer precipitado formado en la etapa (b) para formar una suspensión, (d) tratar la suspensión formada en la etapa (c) con un detergente, (e) precipitar IgG de la suspensión con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 30 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado, (f) resuspender el segundo precipitado formado en la etapa (e) para formar una suspensión, (g) tratar la suspensión formada en la etapa (f) con un disolvente y/o detergente, y (h) realizar al menos un fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico preparando de este modo una composición de IgG concentrada.

En un modo de realización específico, se proporciona una composición de IgG que se prepara por un procedimiento que comprende las etapas de (a) ajustar el pH de una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado hasta aproximadamente 7,0, (b) ajustar la concentración de etanol de la fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado de la etapa (a) hasta aproximadamente un 25 % (v/v) a una temperatura entre aproximadamente -5 °C y aproximadamente -9 °C, formando de este modo una mezcla, (c) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (b), (d) resuspender el precipitado de la etapa (c) con un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con 600 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una suspensión, (e) mezcla dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (d) durante al menos aproximadamente 30 minutos, (f) filtrar la suspensión con un filtro-prensa, formando de este modo un filtrado, (g) lavar el filtro-prensa con al menos 3 volúmenes muertos de filtro-prensa de un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con 150 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una solución de lavado, (h) combinar el filtrado de la etapa (f) con la solución de lavado de la etapa (g), formando de este modo una solución, y tratar la solución con un detergente, (i) ajustar el pH de la solución de la etapa (h) hasta aproximadamente 7,0 y añadir etanol hasta una concentración final de aproximadamente un 25 %, formando de este modo un precipitado, (j) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (i), (k) disolver el precipitado en una solución acuosa que comprende un disolvente o detergente y mantener la solución durante al menos 60 minutos, (l) hacer pasar la solución después de la etapa (k) a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico y eluir las proteínas absorbidas en la columna en un eluato, (m) hacer pasar el eluato de la etapa (l) a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para generar un efluente, (n) hacer pasar el efluente de la etapa (m) a través de un nanofiltro para generar un nanofiltrado, (o) hacer pasar el nanofiltrado de la etapa (n) a través de una membrana de ultrafiltración para generar un ultrafiltrado, y (p) someter a diafiltración el ultrafiltrado de la etapa (o) contra un tampón de diafiltración para generar un diafiltrado que tiene una concentración de proteína entre aproximadamente un 8 % (p/v) y aproximadamente un 12 % (p/v), obteniendo de este modo una composición de IgG concentrada.

En determinados modos de realización, las composiciones de IgG acuosas se preparan usando un procedimiento proporcionado en el presente documento que comprende mejoras en dos o más de las etapas del procedimiento de fraccionamiento descritas anteriormente. Por ejemplo, en determinados modos de realización, las mejoras se pueden encontrar en la etapa de precipitación, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada, y/o la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

En un modo de realización, se proporciona una composición de IgG acuosa que se prepara por un procedimiento de purificación descrito en el presente documento, en el que el procedimiento comprende la adición por pulverización de una o más soluciones que se podrían introducir de otro modo en una fracción de plasma por adición de fluyente. Por ejemplo, en determinados modos de realización, el procedimiento comprenderá la introducción de alcohol (por ejemplo, etanol) en una fracción de plasma por pulverización. En otros modos de realización, las soluciones que se pueden añadir a una fracción de plasma por pulverización incluyen, sin limitación, una solución modificadora de pH, una solución de disolvente, una solución de detergente, un tampón de dilución, una solución modificadora de conductividad, y similares. En un modo de realización preferente, se realizan una o más etapas de precipitación por la adición de alcohol a una fracción de plasma por pulverización. En un segundo modo de realización preferente, se realizan una o más etapas de ajuste de pH por la adición de una solución modificadora de pH a una fracción de plasma por pulverización.

En determinados modos de realización, se proporciona una composición de IgG acuosa que se prepara por un procedimiento de purificación descrito en el presente documento, en el que el procedimiento comprende ajustar el pH de una fracción de plasma que se precipita después de y/o concomitante con la adición del agente de precipitación (por ejemplo, alcohol o polietilenglicol). En algunos modos de realización, se proporciona una mejora del procedimiento en la que el pH de una fracción de plasma que se precipita activamente se mantiene en toda la etapa completa de incubación de precipitación o retención por la monitorización continua y el ajuste del pH. En modos de realización preferentes, el ajuste del pH se realiza por la adición por pulverización de una solución modificadora de pH.

En un modo de realización, la presente invención proporciona composiciones de IgG acuosas que comprenden una concentración de proteína de entre aproximadamente 30 g/l y aproximadamente 250 g/l. En determinados modos de realización, la concentración de proteína de la composición de IgG está entre aproximadamente 50 g/l y aproximadamente 200 g/l, o entre aproximadamente 70 g/l y aproximadamente 150 g/l, o entre aproximadamente 90 g/l y aproximadamente 120 g/l, o cualquier concentración adecuada dentro de estos intervalos, por ejemplo aproximadamente 30 g/l, o aproximadamente 35 g/l, 40 g/l, 45 g/l, 50 g/l, 55 g/l, 60 g/l, 65 g/l, 70 g/l, 75 g/l, 80 g/l, 85 g/l, 90 g/l, 95 g/l, 100 g/l, 105 g/l, 110 g/l, 115 g/l, 120 g/l, 125 g/l, 130 g/l, 135 g/l, 140 g/l, 145 g/l, 150 g/l, 155 g/l, 160 g/l, 165 g/l, 170 g/l, 175 g/l, 180 g/l, 185 g/l, 190 g/l, 195 g/l, 200 g/l, 205 g/l, 210 g/l, 215 g/l, 220 g/l, 225 g/l, 230 g/l, 235 g/l, 240 g/l, 245 g/l, 250 g/l, o mayor. En un modo de realización preferente, la composición de IgG acuosa tendrá una concentración de un o aproximadamente de un 10 %. En un modo de realización particularmente preferente, la composición tendrá una concentración de un $10,2 \pm 0,2$ % (p/v). En otro modo de realización preferente, la composición de IgG acuosa tendrá una concentración de o de aproximadamente un 20 %.

Los procedimientos proporcionados en el presente documento permiten la preparación de composiciones de IgG que tienen niveles muy altos de pureza. En un modo de realización, al menos aproximadamente un 95 % de la proteína total en una composición proporcionada en el presente documento será IgG. En otros modos de realización, al menos aproximadamente un 96 % de la proteína es IgG, o al menos aproximadamente 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o más de la proteína total de la composición será IgG. En un modo de realización preferente, al menos un 97 % de la proteína total de la composición será IgG. En otro modo de realización preferente, al menos un 98 % de la proteína total de la composición será IgG. En otro modo de realización preferente, al menos un 99 % de la proteína total de la composición será IgG.

De forma similar, los procedimientos proporcionados en el presente documento permiten la preparación de composiciones de IgG que contienen niveles extremadamente bajos de agentes contaminantes. Por ejemplo, la tabla 19 proporciona los resultados de la prueba de impurezas para tres soluciones a granel de IgG preparadas por los procedimientos mejorados proporcionados en el presente documento. En determinados modos de realización, se proporcionan composiciones de IgG que contienen menos de aproximadamente 140 mg/l IgA. En otros modos de realización, la composición de IgG contendrá menos de aproximadamente 60 mg/l IgA, preferentemente menos de aproximadamente 40 mg/l IgA, lo más preferentemente menos de aproximadamente 30 mg/l IgA.

En otro modo de realización, se proporcionan composiciones de IgG que contienen menos de aproximadamente 50 mg/l IgM. En otros modos de realización, la composición de IgG contendrá menos de aproximadamente 25 mg/l IgM, preferentemente menos de aproximadamente 10 mg/l IgM, más preferentemente menos de aproximadamente 5 mg/l IgM, más preferentemente menos de aproximadamente 4 mg/l IgM, más preferentemente menos de aproximadamente 3 mg/l IgM, lo más preferentemente menos de aproximadamente 2,5 mg/l IgM.

En otro modo de realización, se proporcionan composiciones de IgG que contienen menos de aproximadamente 100 PL-1 nmol/ml min de actividad amidolítica. En otros modos de realización, la composición de IgG contendrá menos de aproximadamente 50 PL-1 nmol/ml min de actividad amidolítica, preferentemente menos de aproximadamente 25 PL-1 nmol/ml min de actividad amidolítica, más preferentemente menos de aproximadamente 20 PL-1 nmol/ml min de

actividad amidolítica, más preferentemente menos de aproximadamente 15 PL-1 nmol/ml min de actividad amidolítica, lo más preferentemente menos de aproximadamente 10 PL-1 nmol/ml min de actividad amidolítica.

En otro modo de realización, se proporcionan composiciones de IgG que contienen menos de aproximadamente 20 mg/l de fibrinógeno. En otros modos de realización, la composición de IgG contendrá menos de aproximadamente 10 mg/l de fibrinógeno, preferentemente menos de aproximadamente 5 mg/l de fibrinógeno, más preferentemente menos de aproximadamente 2,5 mg/l de fibrinógeno, más preferentemente menos de aproximadamente 1 mg/l de fibrinógeno, más preferentemente menos de aproximadamente 0,5 mg/l de fibrinógeno, lo más preferentemente menos de aproximadamente 0,25 mg/l de fibrinógeno.

Aún en otro modo de realización, se proporcionan composiciones de IgG que consisten principalmente en monómeros/dímeros de IgG. En un modo de realización, se proporciona una composición de IgG en la que al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, o 99,9 % de la IgG es monomérica o dimérica. En un modo de realización preferente, se proporciona una composición de IgG en la que al menos un 97 % de la IgG es monomérica o dimérica. En un modo de realización más preferente, al menos 99 % de la IgG es monomérica o dimérica. En un modo de realización más preferente, al menos 99,5 % de la IgG es monomérica o dimérica. En un modo de realización más preferente, al menos 99,7 % de la IgG es monomérica o dimérica.

2. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona formulaciones y composiciones farmacéuticas que comprenden IgG purificada preparada por los procedimientos proporcionados en el presente documento. En general, las formulaciones y composiciones farmacéuticas de IgG preparadas por los procedimientos novedosos descritos en el presente documento tendrán un contenido en IgG y pureza altos. Por ejemplo, las formulaciones y composiciones farmacéuticas de IgG proporcionadas en el presente documento pueden tener una concentración de proteína de al menos aproximadamente un 7 % (p/v) y un contenido en IgG de pureza mayor de aproximadamente un 95 %. Estas formulaciones y composiciones farmacéuticas de IgG de pureza alta son adecuadas para administración terapéutica, por ejemplo, para tratamiento con IVIG. En un modo de realización preferente, se formula una composición de IgG farmacéutica para administración intravenosa (por ejemplo, tratamiento con IVIG).

En un modo de realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se preparan formulando una composición de IgG acuosa aislada usando un procedimiento proporcionado en el presente documento. En general, la composición formulada se habrá sometido a al menos una, preferentemente al menos dos, lo más preferentemente al menos tres, etapas de inactivación o retirada vírica. Los ejemplos no limitantes de etapas de inactivación o retirada vírica que se pueden emplear con los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen, tratamiento de disolvente-detergente (Horowitz et al., Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Supl. 3):S21-S28 y Kreil et al., Transfusion 2003 (43):1023-1028, de los que ambos se incorporan en el presente documento expresamente por referencia en su totalidad para todos los propósitos), nanofiltración (Hamamoto et al., Vox Sang 1989 (56):230-236 y Yuasa et al., J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, de los que ambos se incorporan en el presente documento expresamente por referencia en su totalidad para todos los propósitos), incubación a pH bajo a temperaturas altas (Kempf et al., Transfusion 1991 (31):423-427 y Louie et al., Biologicals 1994 (22):13-19).

En determinados modos de realización, se proporcionan formulaciones farmacéuticas que tienen un contenido en IgG de entre aproximadamente 80 g/l IgG y aproximadamente 120 g/l IgG. En general, estas formulaciones de IVIG se preparan aislando una composición de IgG de plasma usando un procedimiento descrito en el presente documento, concentrando la composición, y formulando la composición concentrada en una solución adecuada para administración intravenosa. Las composiciones de IgG se pueden concentrar usando cualquier procedimiento adecuado conocido por un experto en la técnica. En un modo de realización, la composición se concentra por ultrafiltración/diafiltración. En algunos modos de realización, el dispositivo de ultrafiltración usado para concentrar la composición empleará una membrana de ultrafiltración que tiene un límite de peso molecular nominal (NMWCO) menor de aproximadamente 100 kDa o menor de aproximadamente 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, o menos kDa. En un modo de realización preferente, la membrana de ultrafiltración tiene un nmWCO de no más de 50 kDa. El intercambio de tampón se puede lograr usando cualquier técnica adecuada conocida por un experto en la técnica. En un modo de realización específico, el intercambio de tampón se logra por diafiltración.

En un modo de realización específico, se proporciona una composición farmacéutica de IgG, en la que la composición de IgG se purificó de plasma usando un procedimiento que comprende las etapas de (a) precipitar una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado, en una primera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 10 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para obtener un sobrenadante enriquecido en IgG, (b) precipitar IgG del sobrenadante con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 30 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un primer precipitado, (c) resuspender el primer precipitado formado en la etapa (b) para formar una suspensión, (d) tratar la suspensión formada en la etapa (c) con un detergente, (e) precipitar IgG de la suspensión con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 30 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado, (f) resuspender el segunda precipitado formado en la etapa (e) para formar

una suspensión, (g) tratar la suspensión formada en la etapa (f) con un disolvente y/o detergente, (h) realizar al menos un fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico; (i) realizar un tratamiento de disolvente-detergente, y (j) someter la composición a nanofiltración, preparando de este modo una composición de IgG.

En un modo de realización específico, se proporciona una composición de IgG farmacéutica, en la que la composición de IgG se purificó de plasma usando un procedimiento que comprende las etapas de (a) ajustar el pH de una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado hasta aproximadamente 7,0, (b) ajustar la concentración de etanol de la fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado de la etapa (a) hasta aproximadamente un 25 % (v/v) a una temperatura entre aproximadamente -5 °C y aproximadamente -9 °C, formando de este modo una mezcla, (c) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (b), (d) resuspender el precipitado de la etapa (c) con un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con 600 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una suspensión, (e) mezcla dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (d) durante al menos aproximadamente 30 minutos, (f) filtrar la suspensión con un filtro-prensa, formando de este modo un filtrado, (g) lavar el filtro-prensa con al menos 3 volúmenes muertos de filtro-prensa de un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con 150 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una solución de lavado, (h) combinar el filtrado de la etapa (f) con la solución de lavado de la etapa (g), formando de este modo una solución, y tratar la solución con un detergente, (i) ajustar el pH de la solución de la etapa (h) hasta aproximadamente 7,0 y añadir etanol hasta una concentración final de aproximadamente un 25 %, formando de este modo un precipitado, (j) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (i), (k) disolver el precipitado en una solución acuosa que comprende un disolvente o detergente y mantener la solución durante al menos 60 minutos, (l) hacer pasar la solución después de la etapa (k) a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico y eluir las proteínas absorbidas en la columna en un eluato, (m) hacer pasar el eluato de la etapa (l) a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para generar un efluente, (n) hacer pasar el efluente de la etapa (m) a través de un nanofiltro para generar un nanofiltrado, (o) hacer pasar el nanofiltrado de la etapa (n) a través de una membrana de ultrafiltración para generar un ultrafiltrado, y (p) someter a diafiltración el ultrafiltrado de la etapa (o) contra un tampón de diafiltración para generar un diafiltrado que tiene una concentración de proteína entre aproximadamente un 8 % (p/v) y aproximadamente un 12 % (p/v), obteniendo de este modo una composición de IgG concentrada.

En determinados modos de realización, se proporciona una composición farmacéutica de IgG, en la que la composición de IgG se prepara usando un procedimiento proporcionado en el presente documento que comprende mejoras en dos o más de las etapas del procedimiento de fraccionamiento descritas anteriormente. Por ejemplo, en determinados modos de realización, las mejoras se pueden encontrar en la etapa de precipitación, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada, y/o la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

En determinados modos de realización, se proporciona una composición farmacéutica de IgG, en la que la composición de IgG se prepara usando un procedimiento de purificación descrito en el presente documento, en el que el procedimiento comprende la adición por pulverización de una o más soluciones que se podrían introducir de otro modo en una fracción de plasma por adición de fluyente. Por ejemplo, en determinados modos de realización, el procedimiento comprenderá la introducción de alcohol (por ejemplo, etanol) en una fracción de plasma por pulverización. En otros modos de realización, las soluciones que se pueden añadir a una fracción de plasma por pulverización incluyen, sin limitación, una solución modificadora de pH, una solución de disolvente, una solución de detergente, un tampón de dilución, una solución modificadora de conductividad, y similares. En un modo de realización preferente, se realizan una o más etapas de precipitación por la adición de alcohol a una fracción de plasma por pulverización. En un segundo modo de realización preferente, se realizan una o más etapas de ajuste de pH por la adición de una solución modificadora de pH a una fracción de plasma por pulverización.

En determinados modos de realización, se proporciona una composición farmacéutica de IgG, en la que la composición de IgG se prepara por un procedimiento de purificación descrito en el presente documento, en el que el procedimiento comprende ajustar el pH de una fracción de plasma que se precipita después de y/o concomitante con la adición del agente de precipitación (por ejemplo, alcohol o polietilenglicol). En algunos modos de realización, se proporciona una mejora del procedimiento en la que el pH de una fracción de plasma que se precipita activamente se mantiene en toda la etapa completa de incubación de precipitación o retención por la monitorización continua y el ajuste del pH. En modos de realización preferentes, el ajuste del pH se realiza por la adición por pulverización de una solución modificadora de pH.

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de IgG que comprende una concentración de proteína de entre aproximadamente 70 g/l y aproximadamente 130 g/l. En determinados modos de realización, la concentración de proteína de la composición de IgG está entre aproximadamente 80 g/l y aproximadamente 120 g/l, preferentemente entre aproximadamente 90 g/l y aproximadamente 110 g/l, lo más preferentemente de aproximadamente 100 g/l, o cualquier concentración adecuada dentro de estos intervalos, por ejemplo aproximadamente 70 g/l, 75 g/l, 80 g/l, 85 g/l, 90 g/l, 95 g/l, 100 g/l, 105 g/l, 110 g/l, 115 g/l, 120 g/l, 125 g/l, o 130 g/l. En un modo de realización preferente, se proporciona una composición farmacéutica que tiene una concentración de proteína de o aproximadamente de 100 g/l. En un modo de realización particularmente preferente, la composición farmacéutica tendrá una concentración de proteína de o aproximadamente de 102 g/l.

En otro modo de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de IgG que comprende una concentración de proteína de entre aproximadamente 170 g/l y aproximadamente 230 g/l. En determinados modos de realización, la concentración de proteína de la composición de IgG está entre aproximadamente 180 g/l y aproximadamente 220 g/l, preferentemente entre aproximadamente 190 g/l y aproximadamente 210 g/l, lo más preferentemente de aproximadamente 200 g/l, o cualquier concentración adecuada dentro de estos intervalos, por ejemplo aproximadamente 170 g/l, 175 g/l, 180 g/l, 185 g/l, 190 g/l, 195 g/l, 200 g/l, 205 g/l, 210 g/l, 215 g/l, 220 g/l, 225 g/l, o 230 g/l. En un modo de realización preferente, se proporciona una composición farmacéutica que tiene una concentración de proteína de o aproximadamente de 200 g/l.

Los procedimientos proporcionados en el presente documento permiten la preparación de composiciones farmacéuticas de IgG que tienen niveles muy altos de pureza. Por ejemplo, en un modo de realización, al menos aproximadamente un 95 % de la proteína total en una composición proporcionada en el presente documento será IgG. En otros modos de realización, al menos aproximadamente un 96 % de la proteína es IgG, o al menos aproximadamente 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o más de la proteína total de la composición será IgG. En un modo de realización preferente, al menos un 97 % de la proteína total de la composición será IgG. En otro modo de realización preferente, al menos un 98 % de la proteína total de la composición será IgG. En otro modo de realización preferente, al menos un 99 % de la proteína total de la composición será IgG.

De forma similar, los procedimientos proporcionados en el presente documento permiten la preparación de composiciones farmacéuticas de IgG que contienen niveles extremadamente bajos de agentes contaminantes. Por ejemplo, en determinados modos de realización, se proporcionan composiciones de IgG que contienen menos de aproximadamente 100 mg/l IgA. En otros modos de realización, la composición de IgG contendrá menos de aproximadamente 50 mg/l IgA, preferentemente menos de aproximadamente 35 mg/l IgA, lo más preferentemente menos de aproximadamente 20 mg/l IgA.

Típicamente, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenderán uno o más agentes tamponadores o agentes estabilizantes de pH adecuados para su administración intravenosa, subcutánea y/o intramuscular. Los ejemplos no limitantes de agentes tamponadores adecuados para formular una composición de IgG proporcionada en el presente documento incluyen glicina, citrato, fosfato, acetato, glutamato, tartrato, benzoato, lactato, histidina u otros aminoácidos, gluconato, malato, succinato, formiato, propionato, carbonato, o cualquier combinación de los mismos ajustada a un pH apropiado. En general, el agente tamponador será suficiente para mantener un pH adecuado en la formulación durante un periodo de tiempo prolongado. En un modo de realización preferente, el agente tamponador es glicina.

En algunos modos de realización, la concentración del agente tamponador en la formulación será entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 400 mM, preferentemente entre aproximadamente 150 mM y aproximadamente 350 mM, más preferentemente entre aproximadamente 200 mM y aproximadamente 300 mM, lo más preferentemente de aproximadamente 250 mM. En un modo de realización particularmente preferente, la composición de IVIG comprenderá glicina entre aproximadamente 200 mM y aproximadamente 300 mM, lo más preferentemente glicina aproximadamente 250 mM.

En determinados modos de realización, el pH de la formulación estará entre aproximadamente 4,1 y aproximadamente 5,6, preferentemente entre aproximadamente 4,4 y aproximadamente 5,3, lo más preferentemente entre aproximadamente 4,6 y aproximadamente 5,1. En modos de realización particulares, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, o 5,6. En un modo de realización preferente, el pH de la formulación estará entre aproximadamente 4,6 y aproximadamente 5,1.

En algunos modos de realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden comprender opcionalmente además un agente para ajustar la osmolaridad de la composición. Los ejemplos no limitantes de agentes de osmolaridad incluyen manitol, sorbitol, glicerol, sacarosa, glucosa, dextrosa, levulosa, fructosa, lactosa, polietilenglicoles, fosfatos, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, gluconoglucoheptonato de calcio, dimetilsulfona, y similares.

Típicamente, las formulaciones proporcionadas en el presente documento tendrán osmolaridades que son comparables con la osmolaridad fisiológica, aproximadamente de 285 a 295mOsmol/kg (Lacy et al., Drug Information Handbook - Lexi-Comp 1999:1254. En determinados modos de realización, la osmolaridad de la formulación estará entre aproximadamente 200mOsmol/kg y aproximadamente 350mOsmol/kg, preferentemente entre aproximadamente 240 y aproximadamente 300mOsmol/kg. En modos de realización particulares, la osmolaridad de la formulación será de aproximadamente 200mOsmol/kg, o 210mOsmol/kg, 220mOsmol/kg, 230mOsmol/kg, 240mOsmol/kg, 245mOsmol/kg, 250mOsmol/kg, 255mOsmol/kg, 260mOsmol/kg, 265mOsmol/kg, 270mOsmol/kg, 275mOsmol/kg, 280mOsmol/kg, 285mOsmol/kg, 290mOsmol/kg, 295mOsmol/kg, 300mOsmol/kg, 310mOsmol/kg, 320mOsmol/kg, 330mOsmol/kg, 340mOsmol/kg, 340mOsmol/kg, o 350mOsmol/kg.

Las formulaciones de IgG proporcionadas en el presente documento son, en general, estables en forma líquida durante un periodo de tiempo prolongado. En determinados modos de realización, las formulaciones son estables durante al menos aproximadamente 3 meses a temperatura ambiente, o al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 8, 9,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses a temperatura ambiente. En general, la formulación también será estable 6 o al menos aproximadamente 18 meses bajo condiciones refrigeradas (típicamente entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C), o durante al menos aproximadamente 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 o 45 meses bajo condiciones refrigeradas.

IV. Procedimientos de tratamiento

Como se practica de forma rutinaria en la medicina moderna, se usan preparaciones esterilizadas de inmunoglobulinas concentradas (en especial IgG) para tratar afecciones médicas que entran dentro de estas tres clases principales: deficiencias inmunitarias, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, e infecciones agudas. Estas preparaciones de IgG también pueden ser útiles para tratar esclerosis múltiple (en especial esclerosis múltiple recurrente-remite o RRMS), enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. La preparación de IgG purificada de la presente invención es adecuada para estos propósitos, así como otros usos clínicamente aceptados de preparaciones de IgG.

La FDA ha aprobado el uso de IVIG para tratar varias indicaciones, incluyendo alotrasplante de médula ósea, leucemia linfocítica crónica, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), VIH infantil, inmunodeficiencias primarias, enfermedad de Kawasaki, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), y trasplante de riñón con un receptor de anticuerpos alto o con un donante ABO incompatible. En determinados modos de realización, las composiciones de IVIG proporcionadas en el presente documento son útiles para el tratamiento o la atención médica de estas enfermedades y afecciones.

Además, se proporcionan comúnmente a pacientes usos fuera de los indicados para IVIG para el tratamiento y la atención médica de varias indicaciones, por ejemplo, síndrome de fatiga crónica, colitis por *Clostridium difficile*, dermatomiositis y polimiositis, oftalmopatía de Graves, síndrome de Guillain-Barre, distrofia muscular, miositis de cuerpos de inclusión, síndrome de Lambert-Eaton, lupus eritematoso, neuropatía motora multifocal, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave, trombocitopenia aloinmunitaria neonatal, infección por Parvovirus B19, pénfigo, púrpura post-transfusión, rechazo a trasplante renal, aborto espontáneo/natural, síndrome de la persona rígida, opsoclonía-mioclonía, septicemia grave y choque séptico en enfermos críticos adultos, necrosis epidérmica tóxica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, e hipogammaglobulinemia. En determinados modos de realización, las composiciones de IVIG proporcionadas en el presente documento son útiles para el tratamiento o la atención médica de estas enfermedades y afecciones.

Finalmente, se ha propuesto el uso experimental de IVIG para el tratamiento y la atención médica de enfermedades que incluyen inmunodeficiencia primaria, RRMS, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (solicitud de patente de los EE. UU. n.º U.S. 2009/0148463, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos). En determinados modos de realización, las composiciones de IVIG proporcionadas en el presente documento son útiles para el tratamiento o la atención médica de inmunodeficiencia primaria, RRMS, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson. En determinados modos de realización que comprenden una administración diaria, una cantidad eficaz que se va a administrar al sujeto se puede determinar por un médico con consideración de las diferencias individuales de edad, peso, gravedad de la enfermedad, vía de administración (por ejemplo, intravenosa frente a subcutánea) y respuesta al tratamiento. En determinados modos de realización, una preparación de inmunoglobulina de la presente invención se puede administrar a un sujeto a de aproximadamente 5 mg/kilogramo a aproximadamente 2000 mg/kilogramo cada día. En modos de realización adicionales, la preparación de inmunoglobulina se puede administrar en cantidades de al menos aproximadamente 10 mg/kilogramo, al menos 15 mg/kilogramo, al menos 20 mg/kilogramo, al menos 25 mg/kilogramo, al menos 30 mg/kilogramo, o al menos 50 mg/kilogramo. En modos de realización adicionales, la preparación de inmunoglobulina se puede administrar a un sujeto en dosis de hasta 100 mg/kilogramo, hasta aproximadamente 150 mg/kilogramo, hasta aproximadamente 200 mg/kilogramo, hasta aproximadamente 250 mg/kilogramo, hasta aproximadamente 300 mg/kilogramo, hasta aproximadamente 400 mg/kilogramo cada día. En otros modos de realización, las dosis de la preparación de inmunoglobulina pueden ser mayores o menores. Además, las preparaciones de inmunoglobulina se pueden administrar en una o más dosis por día. Los médicos familiarizados con las enfermedades tratadas por preparaciones de IgG pueden determinar la dosis apropiada para un paciente de acuerdo con criterios conocidos en la técnica.

De acuerdo con la presente invención, el tiempo necesario para completar un ciclo de tratamiento se puede determinar por un médico y puede variar desde tan solo un día a más de un mes. En determinados modos de realización, un ciclo de tratamiento puede ser de 1 a 6 meses.

Una cantidad eficaz de una preparación de IVIG se administra al sujeto por vía intravenosa. El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una preparación de IVIG que da como resultado una mejora o remedio de la enfermedad o afección en el sujeto. Una cantidad eficaz que se va a administrar al sujeto se puede determinar por un médico con consideración de las diferencias individuales de edad, peso, la enfermedad o afección que se está tratando, gravedad de la enfermedad y respuesta al tratamiento. En determinados modos de realización, una preparación de IVIG se puede administrar a un sujeto a una dosis de aproximadamente 5 mg/kilogramo a aproximadamente 2000 mg/kilogramo por administración. En determinados modos de realización, la dosis puede ser al menos aproximadamente 5 mg/kg, o al menos aproximadamente 10 mg/kg, o al menos aproximadamente 20 mg/kg,

30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg, 1000 mg/kg, 1100 mg/kg, 1200 mg/kg, 1300 mg/kg, 1400 mg/kg, 1500 mg/kg, 1600 mg/kg, 1700 mg/kg, 1800 mg/kg, 1900 mg/kg o al menos aproximadamente 2000 mg/kg.

La dosificación y frecuencia del tratamiento de IVIG dependerá, entre otros factores, de la enfermedad o afección que se está tratando y la gravedad de la enfermedad o afección en el paciente. En general, para disfunción inmunitaria primaria, se administrará una dosis de entre aproximadamente 100 mg/kg y aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal aproximadamente cada de 3 a 4 semanas. Para enfermedades neurológicas y autoinmunitarias, se implementa hasta 2 g/kg de peso corporal durante de tres a seis meses durante un ciclo de cinco días una vez al mes. En general, esto se suplementa con un tratamiento de mantenimiento que comprende la administración de entre aproximadamente 100 mg/kg y aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal aproximadamente una vez cada de 3 a 4 semanas. En general, un paciente recibirá una dosis o tratamiento aproximadamente una vez cada de 14 a 35 días, o aproximadamente cada de 21 a 28 días. La frecuencia del tratamiento dependerá, entre otros factores, de la enfermedad o afección que se está tratando y la gravedad de la enfermedad o afección en el paciente.

En un modo de realización preferente, se proporciona un procedimiento de tratamiento de una inmunodeficiencia, enfermedad autoinmunitaria, o infección aguda en un ser humano que lo necesita, comprendiendo el procedimiento administrar una composición de IVIG farmacéutica de la presente invención. En un modo de realización relacionado, la presente invención proporciona composiciones de IVIG fabricadas de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento para el tratamiento de una inmunodeficiencia, enfermedad autoinmunitaria, o infección aguda en un ser humano que lo necesite.

En determinados modos de realización, la inmunodeficiencia, enfermedad autoinmunitaria, o infección aguda se selecciona de alotrasplante de médula ósea, leucemia linfocítica crónica, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), VIH infantil, inmunodeficiencias primarias, enfermedad de Kawasaki, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), trasplante de riñón con un receptor de anticuerpos alto o con donante ABO incompatible, síndrome de fatiga crónica, colitis por *Clostridium difficile*, dermatomiositis y polimiositis, oftalmopatía de Graves, síndrome de Guillain-Barre, distrofia muscular, miositis de cuerpos de inclusión, síndrome de Lambert-Eaton, lupus eritematoso, neuropatía motora multifocal, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave, trombocitopenia aloinmunitaria neonatal, infección por Parvovirus B19, pénfigo, púrpura post-transfusión, rechazo a trasplante renal, aborto espontáneo/natural, síndrome del hombre rígido, opsoclonía-mioclonía, septicemia grave o choque septicémico en enfermos adultos críticos, necrosis epidérmica tóxica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, hipogammaglobulinemia, inmunodeficiencia primaria, RRMS, enfermedad de Alzheimer, y enfermedad de Parkinson.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan solo a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que se podrían cambiar o modificar para proporcionar esencialmente los mismos resultados o resultados similares.

Ejemplo 1

El presente ejemplo demuestra que se pueden retirar cantidades significativas de fibrinógeno, actividad amidolítica, actividad precalicreína y lipoproteínas de una suspensión de pasta de la fracción II+III modificada extraída por tratamiento con Aerosil antes de la filtración.

Actualmente se usa sílice de combustión (Aerosil 380) para adsorber el fibrinógeno, actividad amidolítica, actividad precalicreína y lipoproteínas. Para investigar el efecto de Aerosil con más detalle, se trataron seis suspensiones de la fracción II+III modificada con cantidades variables de Aerosil antes de la filtración. En resumen, se usó un tampón de disolución que contenía tampón acetato de sodio 5 mM / dihidrogenofosfato de sodio 5 mM pH 4,5 para resuspender la pasta de II+III modificada, preparado como se describe en el presente documento, en una proporción de 15 gramos de tampón de disolución por gramo de pasta de II+III. Después de la adición de la pasta, se agitó la suspensión durante una hora a entre 2 °C y 8 °C en un entorno de pH controlado (límites IPC de pH: 4,9 a 5,3). Se ha descubierto que el pH de esta suspensión normalmente se desplaza hasta un pH de aproximadamente 5,1 y, por tanto, no es necesario un ajuste de pH adicional. Después de una extracción adicional, durante al menos 120 minutos, se añadió Aerosil 380, a entre 0 y 100 mg por gramo de pasta II+III, a los recipientes y se incubaron las suspensiones durante una hora. Se añadió tierra de diatomeas antes de la filtración de profundidad con un filtro Cuno 50SA. Después de la filtración, se lavaron los filtros con tampón de extracción que contenía 8 g l⁻¹ de citrato y polisorbato 80 al 0,2 % (pH 5,0) y se añadió el lavado al filtrado. A continuación, se trató el filtrado combinado y la solución de lavado con Polisorbato 80 para solubilizar adicionalmente impurezas hidrófobas, por ejemplo lipoproteínas, y se precipitó la IgG con etanol al 25 % (pH 7) a entre -8 °C y -10 °C. El precipitado de Ppt G resultante era casi blanco y poseía una pureza de IgG mayor. A continuación, se disolvió el precipitado en agua purificada en una proporción de 7 gramos de agua por 2 gramos de precipitado de Ppt G.

Se analizaron las soluciones de IgG para determinar la recuperación de IgG y las impurezas después de la etapa de filtración con Cuno. Específicamente, se midieron los niveles de actividad amidolítica (PL-1), actividad de PKA, y fibrinógeno (tabla 3). Notablemente, como se observa en la tabla 3, los protocolos de extracción usando de 40 a 60 mg de Aerosil 380 por g pasta de II+III dieron como resultado niveles aceptables de recuperación de IgG con disminuciones significativas en la actividad amidolítica y de PKA, así como una disminución significativa en el nivel de fibrinógeno en el filtrado. En comparación con las extracciones realizadas sin el tratamiento con Aerosil, la adición de 40 mg de Aerosil 380 por gramo de pasta de II+III dio como resultado una reducción de casi un 90 % de la actividad de PKA y del contenido en fibrinógeno y una reducción de un 60 % en la actividad amidolítica, mientras que se mantuvo una recuperación de IgG similar (73 %).

Tabla 1

Efecto de la cantidad de Aerosil 380 en la etapa de filtración con Cuno de II+III (extracción con condiciones de GAMMAGARD® LIQUID)

Aerosil	IgG	IgG	PL-1	PKA	Fibrinógeno
mg g ⁻¹ pasta de II+III	g l ⁻¹ plasma	Recuperación	mmol min ⁻¹ g ⁻¹ proteína (Ppt G)	IU g ⁻¹ proteína (Ppt G)	mg g ⁻¹ proteína (Ppt G)
0	4,9	72 %	1,3	2403	19,5
20	5,2	82 %	0,7	974	8,2
40	4,8	73 %	0,5	290	2,1
60	4,8	71 %	0,3	90	0,1
80	4,2	63 %	por debajo del límite de detección	37	0,0
100	4,3	65 %	por debajo del límite de detección	16	0,0

Ejemplo 2

El presente ejemplo demuestra que se pueden retirar cantidades significativas de fibrinógeno de una suspensión de pasta de la fracción II+III modificada extraída por tratamiento con Aerosil antes de la filtración. Un propósito del presente experimento era encontrar condiciones adecuadas para una retirada de fibrinógeno eficaz sin sufrir pérdidas significativas de IgG.

Se disolvió la pasta de II+III modificada, preparada de acuerdo con el procedimiento proporcionado en el presente documento, en tampón acetato de sodio 5 mM / fosfato de sodio monobásico 5 mM pH 4,5. La proporción de la disolución era de 15 kg de tampón por 1 kg de pasta de II+III. La cantidad de ácido acético añadido se escogió de forma que el pH después de sesenta minutos de agitación fuera de 4,9. Para homogeneizar completamente la suspensión, se agitó hasta veinte horas a de 2 a 8 °C antes de separarse en 6 porciones de 50 ml cada una en vasos de precipitados de 100 ml, en los que ya estaban presentes cantidades variables de Aerosil 380, como se da en la tabla 2. A continuación, se agitaron las soluciones de la suspensión de II+III durante 80 minutos en presencia de Aerosil, antes del procesamiento y análisis. Después de agitar, se centrifugaron todas las muestras con una Heraeus Cryofuge 8500i a 4600 rpm durante 30 minutos a 4 °C en tubos Falcon de 50 ml.

En este experimento, se tomaron las medidas de IgG usando la prueba de nefelometría, que se eligió debido a sus valores más precisos, en comparación con la prueba de ELISA, a las concentraciones altas halladas en las soluciones de la suspensión de II+III. Para minimizar la irritación de la turbidez inespecífica, se filtraron las muestras a través de filtros de 0,45 m antes de la prueba. Para IgM, IgA y fibrinógeno, se prefirieron pruebas de ELISA debido a las menores concentraciones de estas impurezas en la suspensión. Los resultados del experimento se muestran a continuación en la tabla 2.

Para caracterizar adicionalmente el efecto del tratamiento de Aerosil sobre la retirada de fibrinógeno y la pérdida de IgG como se describe en el ejemplo 1, se titularon adicionalmente las concentraciones de Aerosil entre 0 mg y 40 mg por gramo de pasta de II+III modificada. Los resultados mostrados en la tabla 2 confirman la capacidad alta de Aerosil para reducir el fibrinógeno en esta fracción. Notablemente, el uso de 40 mg por gramo de pasta de II+III da como resultado una reducción de casi un 90 % de fibrinógeno, mientras que la recuperación de IgG en la torta de filtro solo se reduce en un 10 %.

Tabla 2.

Resultados de la variación de las condiciones de disolución después de la extracción de II+III con NaAc 5 mM / NaH₂PO₄ 5 mM pH 4,5 a una proporción de disolución de 1 kg de II+III más 15 kg de tampón después de la centrifugación

Condiciones de disolución			Valores en el sobrenadante												
					Proteína (Biuret)			IgM ELISA		IgG nef.		IgA ELISA		Fibrinógeno ELISA	
Condiciones		Tiempo agitación adicional (min)	pH	Conductividad (mS·cm ⁻¹)	(g·l ⁻¹)	(g)	(g·l ⁻¹ plasma)	μg·ml ⁻¹	(g·l ⁻¹ plasma)	mg·ml ⁻¹	(g·l ⁻¹ plasma)	μg·ml ⁻¹	(g·l ⁻¹ plasma)	μg·ml ⁻¹	(g·l ⁻¹ plasma)
Blanco 80 min	mg·g ⁻¹ II+III pasta	80	5,0	1,5	13,76	0,69	8,5	476	0,29	7,19	4,44	993	0,61	400	0,25
Aerosil 5		80	5,0	1,5	13,40	0,67	8,3	457	0,28	7,30	4,51	983	0,61	353	0,22
Aerosil 10		80	5,0	1,5	13,44	0,67	8,3	464	0,29	6,97	4,30	1009	0,62	272	0,17
Aerosil 15		80	5,0	1,5	12,01	0,60	7,4	451	0,28	7,04	4,35	1005	0,62	230	0,14
Aerosil 30		80	5,0	1,5	12,49	0,62	7,7	468	0,29	6,77	4,18	944	0,58	95	0,06
Aerosil 40		80	5,0	1,5	12,21	0,61	7,5	449	0,28	6,71	4,14	899	0,56	41	0,03

Ejemplo 3

- 5 El presente ejemplo demuestra las condiciones adecuadas que permiten una extracción altamente eficaz de IgG de una pasta de la fracción II+III modificada, mientras que se limitan los niveles de impurezas perjudiciales. Específicamente, se examinaron los parámetros que incluyen la concentración de ácido acético usado en el tampón de disolución de II+III y el tratamiento con Aerosil de la solución extraída antes de la filtración.

- 10 Se extrajo la pasta de II+III en acetato de sodio 5 mM, dihidrogenofosfato de sodio 5 mM y cantidades variables de ácido acético concentrado, como se muestra en la tabla 1, durante 180 minutos a entre 2 °C y 8 °C, seguido de la adición de Aerosil 380 como se muestra en la tabla 1. Después de una hora de agitación, se aclaró la suspensión por filtración con Cuno 50A en presencia de tierra de diatomeas. Se llevó a cabo un postlavado del filtro con el mismo tampón que para la extracción excepto por la cantidad diferente de ácido acético, como se da en la tabla 1, usando un 40 % del volumen de la suspensión antes de la filtración. Se realizó la precipitación del precipitado G en presencia de alcohol etílico al 25 %; 8 g·l⁻¹ de citrato de sodio, y Tween 80 al 0,2 % (pH 7) a -8 °C y después de 8 horas de tiempo de retención, se realizó la separación por centrifugación con Heraeus Cryofuge 8500i en vasos de precipitados de acero inoxidable a 4600 rpm durante 30 minutos a -10 °C. Se disolvió el precipitado en una proporción de 1:2 en agua purificada.

- 20 Tabla 3.

La influencia de la cantidad de ácido acético del ajuste del pH del tampón de extracción y la cantidad de Aerosil para el aclarado sobre el rendimiento y la pureza de IgG en Ppt G y la pérdida de IgG en la torta de filtro

	Aerosil (mg g ⁻¹ II+III)	0	20	40	40
tampón de disolución	ácido acético (g l ⁻¹)	0,40	0,40	0,40	0,51
	pH	4,52	4,52	4,52	4,46
extracto II+III	pH	5,00	5,00	5,00	4,94
	conductividad (mS·cm ⁻¹)	1,340	1,340	1,340	1,344
tampón	ácido acético (g·l ⁻¹)	0,12	0,12	0,12	0,12
	pH	5,02	5,02	5,02	5,02
filtrado de II+III	CAE albúmina (%)	11,9	12,5	12,3	10,7
	CAE α/β-globulina	25,5	22,9	18,9	17,2
	CAE proteína	3,2	0,0	0,0	0,0
	CAE (% γ-globulina)	59,4	64,6	68,8	72,1
	pH	5,00	5,03	5,04	4,92
torta de filtro, pérdida	(g·l ⁻¹ plasma)	0,09	0,20	0,56	0,29
PptG disuelto	CAE albúmina (%)	0,3	0,5	0,3	0,3
	CAE α/β-globulina	16,2	14,3	12,5	13,0
	CAE proteína	0,0	0,0	0,0	0,0
	CAE (% γ-globulina)	83,5	85,2	87,2	86,7
	fibrinógeno (mg·l ⁻¹ plasma)	129	32	<4	4
	pKA (IU·mg ⁻¹ proteína)	126	60	9	10
PptG sobrenadante	PL-1 (μmol·ml ⁻¹ ·g ⁻¹)	0,9	0,6	0,5	0,6
	pH	7,20	7,35	7,30	6,96
sobrenadante PptG, pérdida de IgG	(g·l ⁻¹ plasma)	0,14	0,13	0,11	0,09

Como se puede observar en la tabla 1, la adición de Aerosil a la suspensión de la pasta de II+III tiene una marcada influencia sobre la pureza de γ -globulina en la fracción de Ppt G. Sin Aerosil, la pureza de γ -globulina es solo de un 83,5 %, mientras que la adición de 40 mg de Aerosil por gramo de pasta de II+III a la suspensión de la pasta de II+III incrementa la pureza de γ -globulina hasta un 87,2 %. Como se evidencia, el tratamiento con Aerosil da lugar a una reducción significativa de fibrinógeno, actividad de PKA y amidolítica. Una desventaja de la adsorción de impurezas en Aerosil es que la pérdida de IgG en la torta de filtro se incrementa con el incremento de las cantidades de Aerosil. Sin embargo, como se muestra en la tabla 1, las concentraciones mayores de ácido acético en el tampón de extracción contrarrestan parcialmente el efecto de Aerosil sobre la pérdida de IgG en la torta de filtro, y reducen además la pérdida de IgG en la fracción de Ppt G de sobrenadante. Como se puede observar en la tabla 1, el incremento de la cantidad de ácido acético en el tampón de disolución de 400 ml por l de pasta a 510 ml por l de pasta, redujo la cantidad de la pérdida de IgG en la torta de filtro casi en un 50 %. De forma ventajosa, una concentración mayor de ácido acético no afecta a la pureza de γ -globulina en la fracción de Ppt G (puro al 87,2 % usando 400 ml por l de pasta frente al 86,7 % usando 510 ml por l de pasta). Además, los resultados muestran que la diferencia en el valor de pH provocada por la cantidad diferente de ácido acético es insignificante, debido a la alta capacidad del tampón de ácido acético próximo a su valor de pKa de 4,75 (Merck). Esto sugiere que para una mejor precisión en la fabricación a gran escala, se debe añadir en peso ácido acético. Por tanto, la influencia de Aerosil sobre la pureza es mucho mayor que la influencia del ácido acético sobre la pureza, en el intervalo investigado, como se muestra con el contenido en γ -globulina medido por CAE.

Ejemplo 4

Los resultados hallados en el ejemplo 3 sugirieron que la cantidad de IgG perdida en la torta de filtro es fuertemente dependiente de la cantidad de ácido acético usada para el ajuste de pH del tampón de extracción a una concentración de Aerosil dada. Para caracterizar este efecto, se extrajo la pasta de II+III modificada en agua purificada durante aproximadamente 120 minutos para obtener una suspensión homogénea y se dividió en 4 partes. Se ajustaron estas partes a pH 3,8, 4,2, 4,6, y 5,0, respectivamente, con ácido acético 1 M seguido de un segundo tiempo de extracción de otros 120 minutos. Después de esto, se realizó el tratamiento de Aerosil con 40 mg de Aerosil 380 por gramo de pasta de II+III. Después de una hora de agitación, se aclaró la suspensión por filtración con Cuno 50SA en presencia de tierra de diatomeas. Se llevó a cabo el postlavado del filtro con el 100 por cien del volumen de la suspensión anterior a la filtración con tampón de extracción ajustado al pH como se da anteriormente. Se trató el filtrado con 8 g·l⁻¹ de citrato de sodio y Tween 80 al 0,2 %, se ajustó a pH 7,0, y se precipitó la IgG con alcohol al 25 % a -8 °C. Se recuperó el precipitado de PptG por centrifugación a 4600 rpm durante 30 minutos a -10 °C en un Heraeus Cryofuge 8500i usando vasos de precipitados de acero inoxidable. A continuación, se disolvió el precipitado en agua purificada en una proporción de 7 gramos de agua por 2 gramos de precipitado de Ppt G. Después, se sometieron a ensayo las fracciones relevantes para determinar la recuperación de IgG, actividad de PKA, contenido en fibrinógeno y actividad amidolítica, para determinar la dependencia de pH de la recuperación (tabla 4).

Tabla 4

Retirada dependiente del pH de fibrinógeno, actividad de PKA y amidolítica por extracción y aclarado con tratamiento con Aerosil

pH de ácido acético de extracción y aclarado	Concentración de ácido acético después de ajuste de pH (mM)	Pérdida de IgG en la torta de filtro (g·l ⁻¹ plasma)	Pérdida de IgG en sobrenadante de PptG (g·l ⁻¹ ·plasma)	Σ de pérdida de IgG (g·l ⁻¹ ·plasma)	Precipitado G		
					PKA (IU·mg ⁻¹)	Fibrinógeno (mg·l ⁻¹ plasma)	PL-1 (μ mol·ml ⁻¹ ·g ⁻¹)
3,8	75	0,02	0,85	0,87	138	243	-
4,2	25	0,04	0,53	0,57	35	182	-
4,6	10	0,07	0,05	0,12	2	99	2
5,0	5	0,19	0,06	0,25	0,6	3	0,5
3,8	75	-	-	-	116	304	3,8
4,2	25	0,02	0,34	0,36	44	313	2,6
4,6	10	0,04	0,52	0,56	8	148	1,7
5,0	5	0,14	0,09	0,23	3	10	<0,2

La tabla 4 muestra que la retirada de la actividad de PKA, amidolítica (PL-1), y fibrinógeno con Aerosil es menos eficaz a menor pH durante el aclarado. De los resultados obtenidos aquí, se puede observar que el pH más eficaz para la retirada eficaz de la actividad de PKA, amidolítica (PL-1), y fibrinógeno, mientras se mantiene una recuperación de IgG eficaz en la fracción de Ppt G, es de aproximadamente pH 5. Las concentraciones altas de ácido acético dan lugar a

una pérdida de IgG significativa en el sobrenadante de Ppt G ($0,85 \text{ g l}^{-1}$ en presencia de ácido acético 75 mM) mientras que la pérdida de IgG en la torta de filtro se minimiza.

Ejemplo 5

Para determinar la dependencia del tratamiento con Aerosil sobre los resultados hallados en el ejemplo 4, se repitió el experimento, pero con la etapa de tratamiento con Aerosil omitida. En resumen, se extrajo la pasta de II+III modificada en agua purificada durante aproximadamente 120 minutos para obtener una suspensión homogénea y se dividió en 4 partes. Se ajustaron estas partes a pH 3,8, 4,2, 4,6, y 5,0, respectivamente, con ácido acético 1 M seguido de un segundo tiempo de extracción de otros 120 minutos. Después de esto, se aclaró la suspensión por filtración con Cuno 50SA en presencia de tierra de diatomeas. Se llevó a cabo el postlavado del filtro con el 100 por cien del volumen de la suspensión anterior a la filtración con tampón de extracción ajustado al pH como se da anteriormente. Se trató el filtrado con 8 g l^{-1} de citrato de sodio y Tween 80 al 0,2 %, se ajustó a pH 7,0, y se precipitó la IgG con alcohol al 25 % a -8°C . Se recuperó el precipitado de PptG por centrifugación a 4600 rpm durante 30 minutos a -10°C en un Heraeus Cryofuge 8500i usando vasos de precipitados de acero inoxidable. A continuación, se disolvió el precipitado en agua purificada en una proporción de 7 gramos de agua por 2 gramos de precipitado de Ppt G. Después, se sometieron a ensayo las fracciones relevantes para determinar la recuperación de IgG, actividad de PKA, contenido en fibrinógeno y actividad amidolítica, para determinar la dependencia de pH de la recuperación (tabla 5).

Tabla 5.

Retirada dependiente del pH de fibrinógeno, actividad de PKA y amidolítica por extracción y aclarado sin tratamiento con Aerosil

pH de ácido acético de extracción y aclarado	Concentración de ácido acético después de ajuste de pH (mM)	pérdida de IgG en la torta de filtro (g l^{-1} plasma)	pérdida de IgG en sobrenadante de PptG (g l^{-1} plasma)	Σ pérdida de IgG (g l^{-1} plasma)	Precipitado G		
					PKA (IU mg^{-1})	Fibrinógeno (mg plasma l^{-1})	PL-1 ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{g}^{-1}$)
3,8	75	0,00	0,42	0,42	214	173	3,9
4,2	25	0,01	0,19	0,20	170	134	3,2
4,6	10	0,01	0,09	0,10	38	193	1,4
5,0	5	0,09	0,04	0,13	6,4	114	0,4
3,8	75	0,00	0,53	0,53	193	355	3,8
4,2	25	0,00	0,28	0,28	171	346	3,2
4,6	10	0,01	0,14	0,15	131	340	1,5
5,0	5	0,16	0,05	0,21	5,3	189	<0,2

Consistente con los resultados hallados en el ejemplo 4, el incremento en el pH del tampón de extracción/disolución hasta 5,0 dio como resultado un pequeño incremento en la IgG perdida en la torta de filtro, sin embargo, esta pérdida estaba más que compensada por una mayor disminución en la pérdida de IgG en el sobrenadante de Ppt G.

Cuando se comparan los resultados del ejemplo 4 y el ejemplo 5, se puede observar que el tratamiento con Aerosil reduce la cantidad de actividad de PKA residual hallada en la fracción de PptG disuelta cuando se extrae la pasta de II+III a menores pH (3,8, 4,2 y 4,6), pero no a pH 5,0 (figura 2). Por el contrario, el tratamiento con Aerosil reduce significativamente el contenido en fibrinógeno de la fracción de Ppt G disuelta cuando se extrae la pasta de II+III a mayores pH (figura 3; comparar pH 4,6 y 5,0 con pH 3,8 y 4,2). No parece que el tratamiento con Aerosil afecte al nivel de actividad amidolítica residual hallado en la fracción de Ppt G disuelta (figura 4). Notablemente, el nivel de los tres contaminantes en la fracción de Ppt G disuelta se reduce considerablemente cuando se extrae la pasta de II+III a pH 5,0, en comparación con pH 3,8, 4,2 y 4,6.

Ejemplo 6

Como se puede observar en los ejemplos anteriores, las pérdidas de IgG en la torta de filtro y sobrenadantes de Ppt G se minimizan cuando se extrae la pasta de II+III a un pH de alrededor de 4,5 a 4,6. Sin embargo, también se evidencia en los ejemplos anteriores, que las impurezas críticas, incluyendo la actividad de PKA, actividad amidolítica, y contenido en fibrinógeno, son mucho mayores cuando se extrae la pasta de II+III a pH 4,5 o 4,6 en comparación a cuando se produce la extracción a un pH de alrededor de 4,9 a 5,0. En consecuencia, se realizó el presente ejemplo para determinar si los niveles mayores de impurezas observados cuando se extrae la pasta de II+III a pH 4,5 se podían compensar incrementando la cantidad de Aerosil usada para adsorber los contaminantes, mientras se mantienen niveles bajos de pérdida de IgG en la torta de filtro y sobrenadante de Ppt G.

En este sentido, se realizó la extracción de la pasta de II+III modificada como antes, teniendo el tampón de extracción un pH de 4,5. A continuación, se añadieron cantidades crecientes de Aerosil 380, hasta 200 mg por g pasta de II+III, y se agitó la suspensión durante una hora. Se realizó un procesamiento adicional de la muestra como antes.

Como se puede observar en la tabla 6, la retirada tanto de fibrinógeno como de la actividad de PKA se mejora significativamente por el aclarado con cantidades altas de Aerosil. Las pérdidas de IgG en la torta de filtro debido a la unión sobre Aerosil se incrementan con cantidades altas de Aerosil, aunque este efecto se compensó de algún modo por la disminución en la pérdida de IgG en el sobrenadante de Ppt G. Sin embargo, de forma significativa, la actividad amidolítica no se pudo reducir por las cantidades altas de Aerosil cuando se extrae la pasta de II+III a pH 4,5. Además, aunque la pureza de la γ -globulina se mejora con cantidades mayores de Aerosil, en todos los casos aún está por debajo del límite de la especificación de un >86 % para Ppt G, probablemente debido al bajo pH en la extracción y aclarado.

Tabla 6.

La tabla 6 da los resultados de la variación en la concentración de Aerosil con extracción y aclarado de pH 4,5

Cantidad de Aerosil en mg por gramo II+III	pérdida de IgG en la torta de filtro (g l^{-1} plasma)	pérdida de IgG en sobrenadante de PptG (g l^{-1} plasma)	Σ pérdida de IgG (g l^{-1} plasma)	Precipitado G			
				PKA (IU mg^{-1})	Fibrinógeno (mg l^{-1} plasma)	PL-1 ($\mu\text{mol ml}^{-1} \text{g}^{-1}$)	CAE (% gammaglobulina)
0	0,01	0,21	0,22	177,1	272	5,4	69,1
40	0,13	0,50	0,63	9,3	173	1,8	76,8
100	0,11	0,30	0,41	0,1	76	6,1	79,4
200	0,25	0,08	0,33	por debajo del límite de det.	10	4,5	84,1

Ejemplo 7

El presente ejemplo demuestra el efecto del pH del tampón de extracción sobre la retirada de impurezas después de la resuspensión y aclarado de la pasta de II+III.

Se realizó la extracción a pH bajo de la pasta de II+III modificada a pH 4,2 usando una proporción de 15 gramos de tampón por gramo de pasta de II+III. A continuación, se dividió la suspensión en 3 partes y se ajustó el pH a 4,5, 4,7, o 5,0 respectivamente con Tris 3 M. Después de esto, se dividió adicionalmente cada solución en dos partes, que se incubaron durante una hora a 4 °C o bien a 25 °C. Se realizó la filtración con Cuno 50(90)SA usando tampón de postlavado de acetato de sodio 10 mM que tenía el mismo pH que el respectivo tampón de aclarado. Se trataron los filtrados con 8 g l^{-1} de citrato y Tween 80 al 0,2 %, y a continuación, se precipitó la IgG por adición de alcohol etílico al 25 % a -10 °C durante al menos 8 horas. Se recuperó el precipitado por centrifugación como se describe previamente, y se disolvió el precipitado en un volumen por duplicado de agua purificada. Se filtró la suspensión resultante usando un dispositivo de filtración Cuno VR06, en una solución final que tenía una conductividad de aproximadamente 1,3 mS cm^{-1} .

Para evaluar las diversas condiciones, se determinaron los niveles de IgG, IgA, IgM, transferrina, fibrinógeno y otras impurezas. Los resultados del análisis se dan en la tabla 7, que muestra la dependencia del pH del aclarado de la suspensión de la pasta de II+III. Dentro del intervalo de pH de 4,5 a 5,0 la cantidad de IgA, IgM, transferrina y fibrinógeno no varía en un amplio intervalo, pero están presentes otras proteínas no deseadas a mayores niveles cuando se usan tampones con menor pH. Se calculó que estas otras impurezas comprenden un 10 % de la proteína total a pH 4,5, pero menos de un 1 % a pH 5. El contenido en IgG es el mayor a pH 5,0, mientras que la dependencia de la temperatura del contenido en IgG y los niveles de impurezas, entre 4 °C y 25 °C, es insignificante.

Tabla 7.

La tabla 7 compara la reducción de impurezas de II+III disueltas con el filtrado de VR06 por la variación en el pH y la temperatura durante 1 hora de incubación después de la resuspensión de la pasta de II+III y la posterior filtración después de la extracción a pH bajo sin aditivos.

pH de incubación y ambas etapas de filtración	temperatura de incubación y primera etapa de filtración	etapa	% de proteína					
			IgG por nefelometría	IgA por ELISA	IgM por ELISA	transferrina por ELISA	fibrinógeno por ELISA	otras impurezas calculadas
4,5	4 °C	II-III disuelta	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		filtrado con Cuno 90	51,7	8,5	4,0	1,6	2,5	31,7
		Ppt G disuelto	64,4	8,3	4,4	0,1	2,8	20,0
		filtrado VR06	71,8	9,5	5,1	0,1	3,0	10,6
	25 °C	II+III disuelta	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		filtrado con Cuno 90	52,3	8,0	4,2	1,6	2,6	31,3
		Ppt G disuelto	64,5	7,4	4,8	0,1	3,8	19,4
		filtrado VR06	72,5	9,1	5,0	0,1	3,3	9,9
4,7	4 °C	II+III disuelta	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		filtrado con Cuno 50	49,4	8,2	3,7	1,6	2,5	34,6
		Ppt G disuelto	68,8	9,5	5,0	0,1	3,5	13,2
		filtrado VR06	76,5	9,8	5,4	0,1	3,5	4,7
	25 °C	II+III disuelta	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		filtrado con Cuno 50	49,6	8,6	3,7	1,5	3,1	33,6
		Ppt G disuelto	66,9	8,8	4,9	0,1	4,1	15,2
		filtrado VR06	75,8	10,2	5,3	0,1	4,3	4,3
5,0	4 °C	II+III disuelta	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		filtrado con Cuno 50	52,5	9,3	3,4	1,7	2,1	31,0
		Ppt G disuelto	76,9	10,1	4,9	0,1	3,0	5,0
		filtrado VR06	83,6	10,6	4,5	0,1	3,0	0,0
	25 °C	II+III disuelta	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		filtrado con Cuno 50	53,4	8,9	3,4	1,8	2,6	30,0
		Ppt G disuelto	76,6	10,3	4,8	0,1	3,9	4,3
		filtrado VR06	79,9	10,9	4,7	0,1	3,6	0,8

Como se puede observar en la tabla 8, análisis adicionales de la fracción de Ppt G disuelta y filtrado VR06 indican que el uso de tampones que tienen un pH de 4,5 para las etapas de aclarado de II+III y tratamiento de filtrado de II+III, da como resultado un incremento en el nivel de agregados y componentes de bajo peso molecular. Este efecto se potencia además cuando las etapas se llevan a cabo a 25 °C, en vez de a 4 °C. Por el contrario, cuando las muestras se tratan a mayor pH (pH 5,0), las suspensiones de Ppt G y filtrado resultantes contienen niveles de material de ~350 kDa (IgG o IgA dimérica) mayores que los de las soluciones tratadas a pH 4,5 (tabla 8). Además, los tratamientos con menor pH dieron como resultado niveles de actividad amidolítica mayores que con el tratamiento a pH 5,0.

Tabla 8.

Influencia de pH y temperatura durante la incubación y filtración de la suspensión de la pasta de II+III sobre las actividades de PKA y amidolítica del precipitado G disuelto y sobre la distribución de tamaño molecular en el filtrado VR06.

pH de incubación y ambas etapas de filtración	temperatura de incubación y primera etapa de filtración	Ppt G disuelto				filtrado VR06			
		actividad de PKA		actividad amidolítica (PL-1)		distribución de tamaño molecular (%)			
pH	temp. °C	IU ml ⁻¹	IU g ⁻¹	nmol·ml ⁻¹ ·min ⁻¹	nmol·min ⁻¹ ·g ⁻¹	>450 kDa	~350 kDa	~160 kDa	<60 kDa
4,5	4	60,2	2028	171,8	5788	28,33	6,61	63,21	1,85
4,5	25	103,4	3569	239,4	8264	29,44	6,02	61,76	2,79
4,7	4	1343,2	38029	152,1	4306	23,71	8,82	65,82	1,64
4,7	25	2215,9	67702	180,2	5506	24,54	8,02	65,06	2,38
5,0	4	134,5	4009	67,6	2015	17,81	10,78	70,03	1,38
5,0	25	186,6	5738	87,3	2685	19,16	10,54	68,84	1,46

Ejemplo 8

Los resultados presentados en las tablas 7 y 8 muestran que la resuspensión del precipitado de II+III se debe realizar a temperaturas refrigeradas (2 °C a 8 °C) y que el pH se debe mantener a pH 5,0 para minimizar la disolución de los componentes de alto (>450 kDa) y bajo (>70 kDa) peso molecular, así como los componentes que tienen actividad amidolítica. El aclarado eficaz después de la suspensión de la pasta de II+III reducirá la carga de impurezas para el procesamiento posterior por cromatografía de Ppt G y, por tanto, es clave para cumplir las especificaciones del recipiente final de IVIG de forma reproducible. Para validar adicionalmente este hallazgo, se disolvió y se procesó la pasta de II+III modificada, como antes, se disolvió la pasta de II+III paste modificada a pH 4,2 y a continuación, se ajustó a pH de 4,5, 4,7 o 5,0. Como se observa en la tabla 9, se retira la IgM de forma más eficaz por un pH de 5,0 durante la suspensión y aclarado de la pasta de II+III que la retirada a pH 4,5. En este experimento, el rendimiento de IgG es similar a pH 5,0 y 4,5.

Tabla 9

Rendimiento de IgG, IgA, IgM, transferrina y fibrinógeno en diversas etapas de resuspensión de la pasta de II+III, filtración y precipitación de Ppt G

			% rendimiento					
pH de incubación y ambas etapas de filtración	temperatura de incubación y primera etapa de filtración	etapa	Proteína total	IgG nef./ ELISA ¹	IgA por ELISA	IgM por ELISA	transferrina por ELISA	fibrinógeno por ELISA
4,5	4 °C	II+III disuelta	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		filtrado con Cuno 50	100,2	92,9	100,2	97,8	118,7	86,3
		filtrado con Cuno 90	97,0	91,1	105,3	108,6	123,2	80,1
		sobrenadante de Ppt G	33,5	4,4	-	-	-	-
		Ppt G disuelto	71,7	83,9	75,6	89,6	5,0	66,5
		filtrado VR06	65,3	85,2	78,8	93,1	5,2	64,8
	25 °C	II+III disuelta	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		filtrado con Cuno 50	101,0	92,3	100,9	104,4	113,2	96,7
		filtrado con Cuno 90	97,2	92,4	98,9	113,4	123,9	84,6
		sobrenadante de Ppt G	33,8	5,1	-	-	-	-
		Ppt G disuelto	72,9	85,5	68,8	97,5	4,7	89,9
		filtrado VR06	68,3	90,0	78,9	95,9	5,5	75,0
4,7	4 °C	II+III disuelta	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		filtrado con Cuno 50	93,5	83,9	98,0	98,0	115,9	75,3
		sobrenadante de Ppt G	27,5	2,7	-	-	-	-
		Ppt G disuelto	64,8	81,1	78,2	90,2	4,5	73,9
		filtrado VR06	60,5	84,1	75,0	92,1	5,1	70,2

(Continuación)

pH de incubación y etapas de filtración	temperatura de incubación y primera etapa de filtración	etapa	% rendimiento					
			Proteína total	IgG nef./ por ELISA ¹	IgA por ELISA	IgM por ELISA	transferrina por ELISA	fibrinógeno por ELISA
4,7	25 °C	II+III disuelta	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		filtrado con Cuno 50	94,7	85,3	103,1	98,5	113,8	95,8
		sobrenadante de Ppt G	28,5	4,1	-	-	-	-
		Ppt G disuelto	65,3	79,5	73,1	90,9	5,0	87,0
		filtrado VR06	61,9	85,3	80,7	93,0	5,3	86,9
5,0	4 °C	II+III disuelta	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		filtrado con Cuno 50	86,1	82,3	101,5	81,5	117,5	59,8
		sobrenadante de Ppt G	26,0	4,1	-	-	-	-
		Ppt G disuelto	58,1	81,2	74,8	79,3	4,5	57,0
		filtrado VR06	54,0	82,1	72,5	67,8	4,7	52,5
	25 °C	II+III disuelta	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		filtrado con Cuno 50	88,0	85,4	99,7	83,2	124,1	75,4
		sobrenadante de Ppt G	23,4	1,5	-	-	-	-
		Ppt G disuelto	60,5	84,2	79,0	81,6	4,5	78,2
		filtrado VR06	59,0	85,7	82,0	77,6	4,5	69,0

Ejemplo 9

5

Para evaluar el pH óptimo en la etapa de extracción de la pasta de II +III, para actividades proteolíticas minimizadas en el filtrado, se varió el pH durante la extracción y filtración en un intervalo más amplio de pH 3,8 a 7,8. Para este propósito, se extrajo la pasta de II+III modificada a pH bajo en una proporción de 1+8. Después de un tiempo de agitación corto, para obtener una dispersión homogénea, se dividió la suspensión en 8 partes, se ajustó el pH con ácido acético o tampón Tris a pH 3,8, 4,2, 4,6, 5,0, 6,6, 7,0, 7,4 o 7,8, y se extrajo durante 120 minutos adicionales. Después de esto, se ajustó el pH a 5,1 y se realizó el aclarado por centrifugación en tubos Falcon de 50 ml. Se realizó la precipitación de Ppt G bajo condiciones estándar. Se midió la actividad amidolítica y de PKA en la fracción disuelta de Ppt G como se indica en las figuras 5 y 6.

10

15

Como se puede observar en la muestra almacenada a 4 °C en la figura 5, se minimiza la actividad amidolítica cuando se extrae la pasta de II+III a pH 5,0. Destacando además la cuestión de que las muestras no se deben mantener a temperatura elevada (temperatura ambiente) durante periodos de tiempo prolongados, la actividad amidolítica se elevó después del almacenamiento de la fracción disuelta de Ppt G a temperatura ambiente durante una semana. De forma similar, como se observa en la figura 6, se minimiza la actividad de PKA cuando se extrae la pasta de II+III a pH 5,0 o más.

20

Ejemplo 10

El presente ejemplo evalúa la dependencia del pH sobre la pérdida de rendimiento de IgG durante extracción y aclarado. En resumen, se resuspendieron 110 gramos de pasta de II+III modificada en una proporción de 15 gramos de agua purificada por gramo de pasta de II+III, seguido de extracción durante 120 minutos. A continuación, se dividió la muestra en cuatro partes y se ajustó el pH con ácido acético a pH 3,8, 4,2, 4,6 o 5,0. Se realizó la preextracción antes de dividir en cuatro partes al pH original para garantizar cuatro partes idénticas que, a continuación se ajustaron al pH mencionado y se extrajeron además durante una hora adicional. Después, se aclararon las muestras por filtración con Cuno 50SA al mismo pH usado para cada extracción y precipitación de Ppt G. Después de la filtración con Cuno, se trataron todas las partes del mismo modo, lo que quiere decir precipitación del precipitado G estándar a pH 7,0 para todas las partes. Los resultados de dos de dichos experimentos se resumen a continuación en las tablas 10 y 11.

25

30

Tabla 10.

Recuperación de proteína e IgG en los filtrados así como los resultados de MSD y CAE de los precipitados G redisueltos

		38/1				41				
		pH de extracción y aclarado	3,8	4,2	4,6	5,0	3,8	4,2	4,6	5,0
		concentración de ácido acético después de ajuste de pH	75	25	10	5	75	25	10	5
	filtrado	recuperación de proteína (%)	100,3	99,6	92,8	76,0	106,4	107,5	99,7	81,0
		recuperación de IgG (%)	87,6	89,8	90,3	86,0	96,2	97,3	95,1	88,3
Precipitado G	MSD (% área)	>450 kDa	19,2	20,5	14,8	13,2	22,5	22,8	20,7	16,8
		~350 kDa	8,7	7,6	10,5	11,7	5,2	5,0	7,7	9,4
		~160 kDa	69,5	69,2	72,9	74,2	66,0	65,6	67,5	72,0
		<70 kDa	2,7	2,7	1,8	1,0	6,2	5,6	4,1	1,9
	CAE (% gammaglobulina)		67,4	68,3	78,1	86,7	68,3	69,8	77,5	85,1

Tabla 11

Pérdida de IgG durante extracción y aclarado así como actividades proteolíticas y fibrinógeno en el precipitado G redisuelto

					Precipitado G		
pH de ácido acético de extracción y aclarado	concentración de ácido acético después de ajuste de pH (mM)	pérdida de IgG en la torta de filtro (g·l ⁻¹ ·plasma)	pérdida de IgG en sobrenadante de PptG de plasma	Σ pérdida de IgG de plasma	PKA (IU mg ⁻¹)	fibrinógeno (mg·l ⁻¹ ·plasma)	PL-1 (μmol ml ⁻¹ g ⁻¹)
3,8	75	0,00	0,42	0,42	214	173	3,9
4,2	25	0,01	0,19	0,20	170	134	3,2
4,6	10	0,01	0,09	0,10	38	193	1,4
5,0	5	0,09	0,04	0,13	6,4	114	0,4
3,8	75	0,00	0,53	0,53	193	355	3,8
4,2	25	0,00	0,28	0,28	171	346	3,2
4,6	10	0,01	0,14	0,15	131	340	1,5
5,0	5	0,16	0,05	0,21	5,3	189	0,2

Los datos anteriores confirman los resultados mostrados en las figuras 5 y 6 sobre la activación de enzimas proteolíticas por extracción a pH bajo. Tomados conjuntamente, los datos demuestran que la extracción a pH bajo provoca menos pérdida de IgG debido al incremento en la solubilidad de todas las proteínas. Estos resultados son consistentes con los ejemplos proporcionados anteriormente. Adicionalmente, las pérdidas de IgG mostradas en la tabla 11 sugieren que mayores concentraciones de ácido acético, que dan como resultado menor pH, dan como resultado menos pérdida de IgG en la torta de filtro pero mayor pérdida de IgG en el sobrenadante de precipitado G. Este fenómeno se puede explicar por las mayores concentraciones de acetato en la etapa de precipitación después de la extracción a pH bajo.

Ejemplo 11

Para determinar las condiciones de extracción de II+III adecuadas, se comparó un protocolo que emplea extracción a pH bajo con agua purificada ajustada con ácido acético a pH 4,3 y reajuste a pH 4,9 antes de la filtración con la extracción en acetato de sodio 5 mM / dihidrogenofosfato de sodio 5 mM con 600 g de ácido acético por 1000 litros de tampón de extracción, dando como resultado un pH de disolución de 4,8 a 4,9. Los experimentos se realizaron a una escala piloto, comenzando con de 3,8 a 5 kg de la pasta de II+III modificada. Todos los experimentos incluyeron tratamiento con Aerosil con 40 g de Aerosil por kg de pasta de II+III. Para el aclarado, se usó un filtro-prensa Strassburger con bastidores de filtro de 30 cm x 30 cm equipados con láminas de filtro Cuno 50SA. Se realizó el postlavado con 4 volúmenes muertos del filtro-prensa, con un tampón de acetato de sodio 5 mM / dihidrogenofosfato

de sodio 5 mM con 150 gramos de ácido acético por 1000 litros de tampón. Se realizó la centrifugación del precipitado G con una centrífuga Cepa® Z61H a 17000 rpm (diámetro de rotor de 10,5 cm) a un caudal de 40 litros por hora. Los resultados del experimento, realizado por triplicado, se muestran en la tabla 12.

5 Tabla 12

Comparación de la extracción a pH bajo a pH 4,3 y cambio de pH a 4,9 anterior al tratamiento con Aerosil con extracción por condiciones GAMMAGARD® LIQUID mejoradas con 600 g de ácido acético glacial por 1000 l de tampón de extracción

10

experimento	unidad	P00809NG2	F00909NG2	P01509NG2	P02209NG2	P02509NG2	P02609NG2
procedimiento		extracción a pH bajo			600 g HAC por 1000 l tampón de extracción		
pasta de II+III	Lote n.º	VNEGJ039	VNGBJ022	VNGBJ216	VNGBJ216	VNGBJ022	VNEGJ039
	kg	5,00	5,00	4,97	4,96	4,96	3,86
PEQ	l	106,65	118,70	123,32	123,31	117,65	82,35

extracto II+III

proteína	g	1316	1310	1364	1336	1347	1022
rendimiento de proteína (BIURET)	g·l ⁻¹	12,3	11,0	11,1	10,8	11,5	12,4
rendimiento de IgG (ELISA)	g·l ⁻¹	6,09	5,89	6,25	5,50	6,06	6,38
rendimiento de IgG (ELISA)	g·l ⁻¹	1,06	0,96	0,98	1,00	1,01	1,10
rendimiento de IgG (ELISA)	g·l ⁻¹	0,40	0,40	-0,47	0,40	0,43*	0,48

filtrado

proteína	g	957	1007	1038	955	926	731
rendimiento de proteína (BIURET)	g·l ⁻¹	9,0	8,5	8,4	7,7	11,5	12,4
rendimiento de IgG (ELISA)	g·l ⁻¹	5,7	5,62	5,45	5,02	6,06	6,38
rendimiento de IgG (ELISA)	g·l ⁻¹	1,03	0,88	0,96	0,90	1,01	1,10
rendimiento de IgG (ELISA)	g·l ⁻¹	0,32	0,39	0,37	0,27	0,43	0,48

extracto de torta de filtro

rendimiento de IgG (ELISA)	g·l ⁻¹	-	-	-	0,07	0,07	0,07
----------------------------	-------------------	---	---	---	------	------	------

sobrenadante de Ppt G

proteína	g	196	130	188	197	168	109
rendimiento de proteína (BIURET)	g·l ⁻¹	1,8	1,1	1,5	1,5	1,4	1,3
rendimiento de IgG (ELISA)	g·l ⁻¹	0,05	0,02	0,03	0,05	0,03	0,04

Como se observa en la tabla 12, ambos protocolos de extracción dan como resultado recuperaciones de IgG similares. Dados los resultados de los ejemplos 3 a 10, que muestran que se pueden minimizar varias impurezas por la extracción de la pasta de II+III a pH 5,0, los resultados proporcionados en la tabla 12 muestran que la extracción a pH de 4,8 a 4,9 con 600 g de ácido acético glacial por 1000 l de tampón de extracción es superior a la extracción a pH bajo y el posterior ajuste a pH de 4,8 a 5,0.

15

Ejemplo 12

20

Durante la fabricación, los bastidores y líneas del filtro-prensa que se conectan a y desde los depósitos tienen un volumen de vacío significativo, que aún está lleno con suspensión o filtrado antes de que se inicie el postlavado. Cuando se finaliza el postlavado, este volumen de vacío permanece en la filtro-prensa. Los protocolos estándar representan este volumen de vacío lavando con entre uno y dos volúmenes muertos del filtro-prensa. Para determinar si los lavados postfiltro estándar permiten una recuperación eficaz de IgG total, se realizaron experimentos usando volúmenes variables del tampón de lavado en purificaciones de IgG de fabricación a gran escala. La figura 1 muestra la dependencia de los volúmenes postlavado (medidos por volúmenes muertos o de vacío) sobre los niveles de IgG residual y proteína total.

25

30

Notablemente, como se observa en la figura 1, un lavado postfiltración usando aproximadamente un volumen muerto de filtro-prensa por duplicado da como resultado una pérdida significativa de la recuperación de IgG, ya que la solución de lavado contiene aproximadamente 1,5 gramos de IgG por l de solución de lavado. De forma sorprendente, se descubrió que se requiere un volumen muerto de filtro-prensa de 3,6 veces de tampón postlavado para una

recuperación eficaz de IgG (indicado por una flecha en la figura 1). El postlavado adicional de más de 3,6 volúmenes muertos de la filtro-prensa no es conveniente, ya que dará lugar a la dilución del filtrado sin la recuperación de IgG adicional.

5 Ejemplo 13

10 Durante la etapa de precipitación de II+III, se incrementó la concentración de alcohol de un 20 a un 25 % y se redujo la temperatura de -5 °C a -7 °C. Cuando se disolvió la pasta de II+III, se usaron al menos 600 ml de ácido acético glacial por 1000 l de volumen para ajustar el pH del tampón de resuspensión de la pasta de II+III, al contrario que el uso previo de la proporción de 510 ml de ácido acético glacial / 1000 l tampón. La proporción de extracción fue re 1 + 15 con el tampón de ácido acético. Para el aclarado, se añadieron de 0,04 a 0,06 gramos de Aerosil (típicamente, en el extremo inferior de este intervalo, por ejemplo, 0,04 g) para cada gramo de la pasta de II+III. Para el postlavado, se usaron cuatro (4 x) volúmenes muertos de filtro-prensa de post-tampón de lavado. Por ejemplo, se usaron 4,3 x volúmenes muertos de filtro-prensa en un experimento particular mientras que se usaron 3,6 x volúmenes en otro experimento. 15 Los volúmenes muertos de cuatro veces o más se incrementaron de los volúmenes muertos 1,8 x usados previamente. Se ajustó el tampón con 150 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, un incremento respecto de 120 ml de ácido acético glacial / 1000 l de tampón usados previamente. Estos cambios dieron lugar a un rendimiento de de IgG un 8 % mayor y una pureza de al menos un 86 % de γ -globulina. Se descubrió una cantidad residual muy baja de IgG en el extracto de la torta de filtro, cuando se extrajo con fosfato de sodio 0,1 M + NaCl 150 mM (pH 7,4, conductividad 25,5 mS/cm). 20

Ejemplo 14

25 A. Optimización de fraccionamiento I: adición de etanol por pulverización frente a adición como fluyente; ajuste de pH a pH 7,0 o 7,5 después de la adición de etanol

La tabla 13 muestra el rendimiento de IgG por los procedimientos de fabricación actualmente en uso y proporciona una referencia de comparación en los experimentos descritos a continuación. Se pierde un 15-20 % de IgG de la reserva de Cohn al filtrado. Se pierden aproximadamente 0,4 g de IgG por litro de plasma en el sobrenadante de II+III.

30 Tabla 13

	Rendimiento de IgG (2009)					
	g/l plasma			% de reserva de Cohn		
Fracción	LA B1 (fuente)	Viena (fuente)	LA B5 (Rec.)	L.A. (fuente)	Viena (fuente)	L.A. (Rec.)
Reserva de Cohn	6,18 (5,28-7,02)	6,26 (5,43-6,68)	7,49 * (6,41-8,41)	100	100	100
sobrenadante II+III	0,41 (0,23-0,63)	0,39 (0,33-0,47)	0,37 (0,23-0,48)	6,6	6,2	4,9
precipitado II+III (calculado)	5,77	5,87	7,12	93,4	93,8	95,1
filtrado II+III	4,93 (4,21-5,57)	5,19 (4,11-5,48)	6,43 (6,11-7,02)	80	83	86

* LA B5, reserva de Cohn de plasma recuperado: menor concentración de IgG debido a la solución salina. Promedio de LA B1, reserva de Cohn de plasma recuperado: 8,52 g/l.

Procedimiento

35 La reserva de Cohn se descongeló a 24-27 °C durante 6-7 horas en un cubo de 14 litros. Después de esto, se mezcló el material durante la noche a 2-8 °C. A continuación, se dividió la reserva en cuatro partes (800 g cada una):
 1: adición de etanol como fluyente, seguido de ajuste de pH a 7,0
 2: adición de etanol como fluyente, seguido de ajuste de pH a 7,5
 40 3. adición de etanol por pulverización, seguido de ajuste de pH a 7,0
 4. adición de etanol por pulverización, seguido de ajuste de pH a 7,5

En primer lugar, se enfriaron todas las partes hasta 0 °C. A continuación, se añadió etanol al 8 % a las partes 1 y 2 como fluyente y por pulverización a las partes 3 y 4 usando una cabeza de pulverización. En ambos procedimientos se añadió etanol aproximadamente a la misma velocidad. Durante la adición de etanol, se ajustó el criostato a -5 °C y se añadieron 75 ml de etanol a cada parte mientras se mezclaba. Se ajustó el pH a 7,0 o bien 7,5 por ácido acético 1 M. A continuación, se incubó la solución durante 1 hora. Después de la incubación, se centrifugó la solución con una centrífuga con vaso de precipitados (4600 rpm; 30 min; -2 °C). 45

Resultados

Los rendimientos de IgG se midieron de forma nefelométrica y se muestran en la tabla 14. Se obtuvo casi el 100 % del rendimiento de IgG en el sobrenadante del fraccionamiento I con el procedimiento mejorado (pulverización de etanol) mientras que con la adición convencional de etanol se perdió de 0,2 a 0,25 g/l plasma. Estos resultados indican que el procedimiento mejorado puede dar lugar a un incremento del rendimiento de IgG de hasta 0,2 g/l plasma en la fabricación.

Tabla 14

Muestra	Peso (g)	IgG por nef. (media de 3)				
		mg/ml	g	%	Pureza (%)	g/l plasma
Plasma desprovisto de crioprecipitado	800	5,72	4,57	100,00	12,2	5,72
Sobrenadante 1	856	5,10	4,37	95,57	12,6	5,46
Sobrenadante 2	853	5,16	4,41	96,36	12,7	5,51
Sobrenadante 3	853	5,36	4,58	100,14	13,1	5,72
Sobrenadante 4	848	5,33	4,52	98,90	13,0	5,65

B. Escala piloto: fraccionamiento I (pulverización frente a fluyente; ajuste de pH a 7,4 después de la adición de etanol) y fraccionamiento II+III (ajuste de pH a 6,7 antes de la adición de etanol, reajuste a 6,9 después de la adición de etanol)

Ejemplo 15

Procedimiento

Se descongelaron 2,8 kg de plasma mientras se mezclaba a 2 °C. Fracción I: se añadió etanol al 8 % y se ajustó el pH a 7,4 usando ácido acético 5 M. Mientras se mezclaba, se enfrió la suspensión hasta una temperatura de -2 °C. Se obtuvieron las condiciones de pulverización usando una cabeza de pulverización. En ambos procedimientos, la adición de etanol y ácido acético 5 M se realizó aproximadamente a la misma velocidad. Después de una 1 hora de incubación, se centrifugó la solución usando una centrífuga CEPA a una temperatura de -4 °C.

Fracción II+III: se ajustó el pH a 6,7 usando un tampón de pH 4, después se añadió etanol al 25 % (1) por pulverización o (2) como fluyente como se realizó de forma convencional. A continuación, se reajustó el pH a 6,9. Se llevó a cabo la incubación durante 10 horas a -7 °C.

Resultados

Se midió nefelométricamente la pérdida de IgG durante la fracción II+III con etanol al 25 % y se muestra en la tabla 15. Las medidas de IgG tenían una cierta variación, por lo que se tomó el valor promedio del procedimiento optimizado.

Tabla 15

	Fracción I, pérdida de IgG	Sobrenadante de fracción II+III, etanol añadido al 25 %	IgG en el filtrado
Experimento	g por litro de plasma	g por litro de plasma	% de reserva de Cohn
NG2C73	0,47	0,08	85,28
NG2C73-1	0,34	0,03	92,27
NG2C73-2	0,05	0,06	95,94
Promedio	0,29	0,06	91,16
Referencia (adición de etanol como fluyente)	0,29	0,10	87,38

Hasta el punto del precipitado de la fracción II+III, solo se perdieron 0,35 g IgG/l plasma. Se logró un incremento en el rendimiento de 0,04 g IgG por litro de plasma durante el fraccionamiento II+III usando el procedimiento de pulverización, en comparación con la adición de etanol al 25 % como fluyente;

y se logró un incremento en el rendimiento de 0,3 g IgG por litro de plasma (promediado a partir del intervalo de 0,4 a 0,06 g/l), en comparación con la adición de etanol al 20 % como fluyente como se usa actualmente en la fabricación. El

rendimiento de IgG en el filtrado es significativamente mayor en comparación con la referencia y muy por encima del 80 al 86 % logrado actualmente en la fabricación con la adición de etanol al 20 % como fluyente en la precipitación de II+III.

- 5 C. Fraccionamiento II+III (etanol al 20 %): se mantiene el pH inicial durante todo el fraccionamiento II+III

Ejemplo 16

Procedimiento

- 10 Se descongelaron 50 litros de plasma mientras se mezclaba a 17-20 °C durante 27 horas. Se realizó el fraccionamiento I como se menciona en las secciones anteriores como el procedimiento optimizado. Se separó el sobrenadante I en dos partes:

- 15 (1) ajuste de pH en el peor caso: ajuste de pH antes y después de la adición de etanol pero no durante el periodo de incubación.

- (2) ajuste de pH optimizado: ajuste de pH antes y después de la adición de etanol y además reajuste del pH durante el tiempo de retención. Se agitó constantemente la solución durante el tiempo de retención.

- 20 Se ajustó el pH del sobrenadante de I en ambas partes a 6,7 antes de la adición de etanol usando un tampón de pH 4. Se añadió etanol por pulverización y se reajustó el pH a 6,9 después de la adición de etanol.

- 25 En la parte (1) se llevó a cabo el ajuste de pH con menor cuidado para simular el peor de los casos. Se ajustó el pH de la solución directamente después de la adición de etanol pero no durante la incubación. En la parte (2) se reajustó el pH hasta un valor constante de 6,8 a 7,0 durante el tiempo de incubación de 10 horas.

Resultados

- 30 Se midió de nuevo de forma nefelométrica la IgG y se muestra en la tabla 16. Por el reajuste constante del pH a un valor constante de aproximadamente 6,9 durante el tiempo de retención, solo se perdieron 0,13 g IgG por litro de plasma en comparación con un promedio de 0,4 g/l plasma en la fabricación a gran escala. Se logró un incremento en el rendimiento de 0,07 g IgG por litro de plasma en comparación con la referencia (sin pulverización pero con agitación constante durante el periodo de retención). Se logró un incremento en el rendimiento de aproximadamente 0,20 g a aproximadamente 0,30 g IgG por litro de plasma en comparación con el procedimiento convencional actualmente en uso (pérdida de 0,38 g IgG por litro de plasma, véase la tabla 13).

Tabla 16

	Muestra	Volumen	IgG medida por nefelométricamente	
		kg	Rendimiento (%)	g/l plasma
Reserva	Plasma	45,20	100,00	4,90
Fracción I	Sobrenadante I	68,66	102,61	5,03
Ajuste de pH optimizado	Sobrenadante II+III	53,09	0,26	0,13
Referencia	Sobrenadante II+III	52,69	0,41	0,20

Conclusión

- 40 Se reduce la pérdida de IgG en el sobrenadante de II+III del nivel actual de 0,4 g IgG/l plasma en lotes de fabricación a un nivel de 0,13 g/l plasma en precipitación con etanol al 20 %, y a un nivel de menos de 0,08 g/l plasma en precipitación con etanol al 25 % cuando se añade etanol por pulverización y se mantiene un pH continuo de $6,9 \pm 0,1$ durante la precipitación.

- 45 En la precipitación I, la adición de etanol antes del ajuste de pH por pulverización da lugar a un incremento en el rendimiento de IgG de 0,1 a 0,2 g/l plasma en el sobrenadante de fraccionamiento I.

Análisis

- 50 Se midió nefelométricamente la IgG en todos los experimentos y puede tener una varianza de al menos $\pm 5,0$ % (como se indica por el fabricante del nefelómetro, Siemens AG). Por lo tanto, es posible que el incremento en el rendimiento real obtenido por el procedimiento mejorado durante la fabricación pueda ser ligeramente menor o mayor que el indicado en los ejemplos.

55

Como prueba adicional del incremento en el rendimiento por el nuevo y mejorado procedimiento, se comparó el peso de IgG del precipitado con el promedio del peso de IgG del precipitado obtenido de la misma fuente de plasma en la fabricación. Se obtienen 18 kg de IgG de precipitado por 1000 litros de la reserva de Cohn de la fuente por el procedimiento usado actualmente en la fabricación, al contrario que el estudio a escala piloto (sección B anterior) en el que se obtuvieron 20,8 kg de IgG de precipitado (etanol al 20 % y ajuste de pH optimizado en el fraccionamiento II+III, adición de tampón y de etanol por pulverización). Esto es un incremento de más de 2 kg de IgG de precipitado por 1000 litros de reserva de Cohn.

Ejemplo 17

Este ejemplo demuestra que la adición de una etapa de tratamiento de sílice de combustión anterior a la filtración de la suspensión de la fracción II+III da como resultado filtrados de IgG de mayor pureza. En resumen, se fraccionó plasma desprovisto de crioprecipitado como se describe anteriormente a la fase de fracción II+III, punto en el que se dividió en dos muestras. La primera muestra se aclaró solo por adición de coadyuvante de filtro a la filtración de la suspensión de fracción II+III estándar (figura 7A). La segunda muestra se sometió al pretratamiento de sílice de combustión, como se describe en el presente documento, anterior a la adición del coadyuvante de filtro y la filtración de la suspensión de fracción II+III estándar (figura 7B).

A continuación, se separaron los componentes de proteína de los filtrados por electroforesis de acetato de celulosa y se calcularon las áreas de los picos individuales usando procedimientos estándar. Como se puede observar en las cromatografías y datos cuantificados, la segunda muestra, que se trató con sílice de combustión antes de la filtración, dio como resultado un filtrado con una pureza de IgG mucho mayor que la muestra no tratada con sílice de combustión (68,8 % frente al 55,7 de γ -globulina; comparar la tabla 18 con la tabla 16).

Tabla 17. Cuantificación de picos de proteína separados por electroforesis de acetato de celulosa de la suspensión de la fracción II+III aclarada por adición de coadyuvante de filtro solo antes de la filtración, mostrado en la figura 7A.

Número de pico de izquierda a derecha	área (%)	fracción
1	55,7	γ -globulina
2	3,2	proteína desnaturalizada
3	3,7	γ -globulina
4	25,5	α/β -globulina
5	11,9	albúmina

Tabla 18. Cuantificación de picos de proteína separados por electroforesis de acetato de celulosa de la suspensión de la fracción II+III pretratada con sílice de combustión y aclarada por adición de coadyuvante de filtro antes de la filtración, mostrado en la figura 7B.

Número de pico de izquierda a derecha	área (%)	fracción
1	68,8	γ -globulina
2	18,9	α/β -globulina
3	12,3	albúmina

Ejemplo 18

El presente ejemplo ilustra la ultrafiltración y la formulación de una preparación de IgG al 20 % adecuada para la administración subcutánea. Esta información se recopiló durante la producción de preparaciones de IgG al 20 % escaladas y preclínicas. El procedimiento usado para la fabricación de lotes al 20 % antes de la etapa de nanofiltración fue como se describió anteriormente. Se mejoró la ultra-/diafiltración para concentrar la solución a un 20 %. Para reducir la pérdida en el rendimiento hasta un mínimo, se concentra el postlavado del dispositivo de ultrafiltración usado para diafiltración por un segundo dispositivo más pequeño equipado con las mismas membranas y después de esto se añade a la solución a granel.

Sorprendentemente, se pudo demostrar que la inactivación vírica durante el almacenamiento a pH bajo no está influenciada por la concentración de proteína de la solución. Se logró una reducción vírica similar tanto en la solución al

10 % (GAMMAGARD® LIQUID) como en la solución al 20 %. Por lo tanto, se mantuvo el almacenamiento a pH bajo como una etapa de reducción vírica para el producto al 20 %.

Antes de la nanofiltración, se ajusta la concentración de glicina de la solución de IgG a un objetivo de 0,25 M. A continuación, se concentra la solución hasta una concentración de proteína de un 6 ± 2 % p/v a través de ultrafiltración (UF). Se ajusta el pH a $5,2 \pm 0,2$. La membrana de UF usada tiene un límite de peso molecular nominal (NMWCO) de 50.000 daltons o menos y en especial se diseña para productos de alta viscosidad (por ejemplo, V Screen de Millipore).

A continuación, se somete a diafiltración el concentrado frente a solución de glicina 0,25 M, pH $4,2 \pm 0,2$. El volumen de intercambio mínimo es 10 veces el volumen del concentrado original. En toda la operación de ultrafiltración/diafiltración, se mantiene la solución a entre aproximadamente 4 °C y 20 °C.

Después de la diafiltración, se concentra la solución hasta una concentración de proteína de al menos un 22 % (p/v). Se ajusta la temperatura de la solución a de 2 °C a 8 °C.

Para recuperar la proteína residual completa en el sistema, se realiza el postlavado del primer sistema de ultrafiltración más grande con al menos 2 veces el volumen muerto en el modo de recirculación para garantizar que toda la proteína se separa por lavado. A continuación, se concentra el post-lavado del primer sistema de ultrafiltración hasta una concentración de proteína de al menos un 22 % p/v con un segundo sistema de ultra-/diafiltración equipado con el mismo tipo de membrana que está dimensionada una décima parte o menos de la primera. Se añade el concentrado de postlavado a la solución a granel. A continuación se somete a postlavado el segundo sistema de ultrafiltración. Este postlavado se usa para el ajuste de la concentración de proteína de la formulación final. Se mantiene la temperatura de la solución a entre aproximadamente 2 °C y 8 °C.

Para formular la solución final, se ajusta la concentración de proteína hasta aproximadamente $20,4 \pm 0,4$ % (p/v) con post-lavado del segundo sistema de ultrafiltración más pequeño y/o con tampón de diafiltración. Se ajusta el pH a entre aproximadamente 4,4 a 4,9, en caso necesario.

Ejemplo 19

Para comparar la fracción de IgG recuperado en el filtrado de la fracción II+III en el procedimiento de fabricación GAMMAGARD® LIQUID actual, se realizaron cinco purificaciones de IgG a escala de fabricación usando los procedimientos de precipitación y disolución de la fracción II+III mejorados proporcionados en el presente documento. En resumen, se realizó la precipitación de reservas de Cohn de IgG con una concentración de IgG de partida de aproximadamente 6,14 g/l a -7 °C con etanol al 25 % incorporado por adición de fluyente, en comparación con -5 °C y etanol al 20 %, como se emplea en el procedimiento de fabricación actual. A continuación, se extrajo 1 a 15 el precipitado de la fracción II+III modificada con un tampón de disolución con un pH de 4,3 o ajustado con ácido acético glacial al 0,06 %, y posteriormente se filtró a través de un filtro de profundidad con un lavado final de 4,3 volúmenes de filtro muertos de tampón de disolución. Como se observa en la tabla 18, el filtrado de la fracción II+III modificada preparada de acuerdo con los procedimientos mejorados proporcionados en el presente documento contenía un porcentaje significativamente mayor (un incremento de al menos un 8,0 %) de la IgG presente en la reserva de Cohn de partida que el del filtrado de la fracción II+III preparado de acuerdo con el presente procedimiento de fabricación (91,1 % y 91,6 % frente a un 83,1 % y 83,8 %, respectivamente).

Tabla 18. Promedio de recuperación de IgG en el filtrado de la fracción II+III de todos los ciclos de fabricación de Baxter realizados en Viena durante 2008 y parte de 2009, en comparación con la recuperación de IgG en lotes fabricados de acuerdo con los procedimientos mejorados proporcionados en el presente documento.

Procedimiento	Fabricación en Viena		Escalado R y D**	
	Actual	2008		
IgG en reserva de Cohn (g/l)	6,26	6,31	6,14	6,13
Alcohol en precip. II+III (%)	20	20	25	25
ml ácido acético /1000 l de tampón de disolución	510	510	Disolución a pH 4,3; cambio a 4,9 antes de filtración	600
Aerosil (g/g pasta)	0,045	0,04	0,04	0,04
Post-lavado en volúmenes muertos de filtro-prensa	1,8	1,8	4,3	4,3
Promedio IgG en filtrado (% de reserva de Cohn)	83,1 % 57 lotes	83,8 % 200 lotes	91,1 % 3 lotes	91,6 % 2 lotes
IgG adicional en el filtrado	n.a.	n.a.	+ 8,0 %	+ 8,5 %

Ejemplo 20

Para determinar la pureza de las composiciones de IgG proporcionadas en el presente documento, se prepararon tres lotes de IgG de acuerdo con los procedimientos mejorados proporcionados en el presente documento. A continuación, se sometieron a prueba los productos de IgG finales de estas purificaciones para varios contaminantes, incluyendo IgA, IgM, actividad amidolítica, C3, y fibrinógeno, así como para determinar el porcentaje de monómeros/dímeros de IgG en la composición final. Como se puede observar en la tabla 19 a continuación, los procedimientos mejorados de fabricación proporcionados en el presente documento dan como resultado composiciones a granel finales con un incremento en la recuperación de IgG, de un 73,6 % a un 78,5 % del material de partida en comparación con de un 60 % a un 70 % para procedimientos empleados en la actualidad, mientras que se mantienen los perfiles de pureza que son tan buenos, o mejores, que los estándares de fabricación de IgG actuales.

Tabla 19. Niveles de impurezas y composición de monómeros/dímeros de IgG en la composición de IgG preparada de acuerdo con los procedimientos de fabricación mejorados proporcionados en el presente documento.

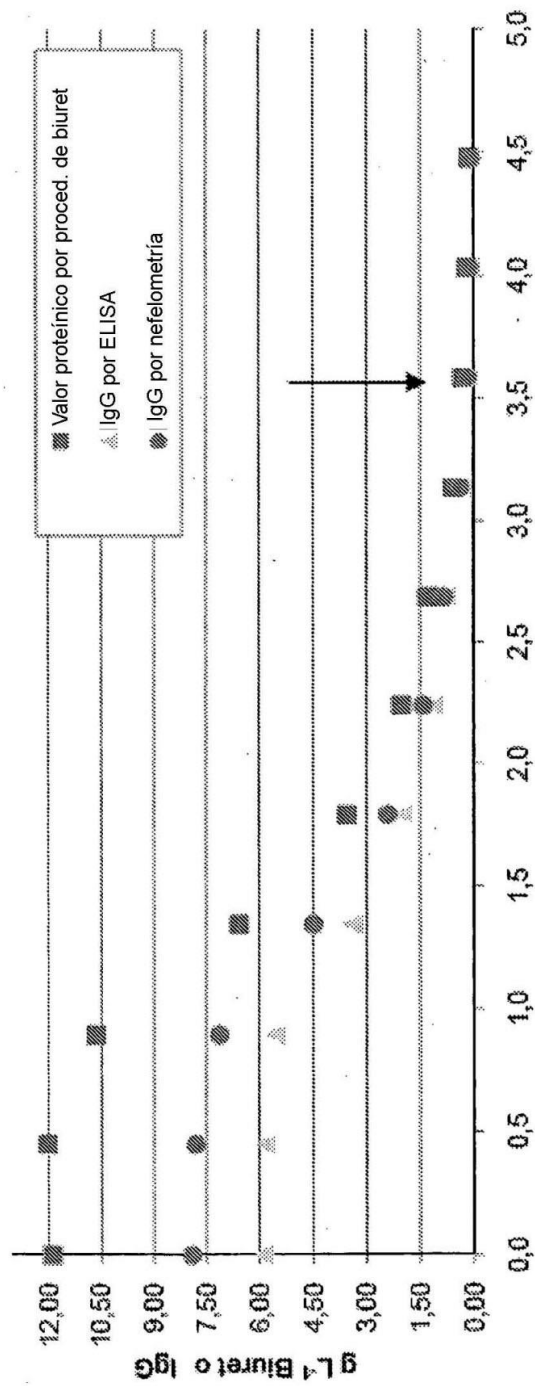
Opción	1	3	6
N.º de experimento (P0..10NG2)	19	20	21
Rendimiento de proteína en flujo continuo de ANX [g/l plasma]	4,35	4,35	4,38
Recuperación IgG: material de partida de Cohn con respecto al granel [%]	73,6	78,5	78,5
Caracterización del granel final			
IgA [µg/ml con proteína al 10 %]	29	26	pend.
IgM [µg/ml con proteína al 10 %]	1,1	1,1	pend.
actividad amidolítica [PL-1 nmol/ml min]	pend.	<10	<10
monómeros/dímeros MSD [%]	99,7	99,9	99,7
C3 [µg/ml con proteína al 10 %]	pend.	pend.	pend.
Fibrinógeno [µg/ml con proteína al 10 %]	<0,2	pend.	pend.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una composición de IgG enriquecida a partir de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
 - (a) precipitar una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado, en una primera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 10 % a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante;
 - (b) precipitar la IgG del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 25 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado;
 - (c) resuspender el segundo precipitado para formar una suspensión;
 - (d) precipitar la IgG de la suspensión formada en la etapa (c), en una tercera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 22 % y aproximadamente un 28 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un tercer precipitado;
 - (e) resuspender el tercer precipitado para formar una suspensión; y
 - (f) separar la fracción soluble de la suspensión formada en la etapa (e), formando de este modo una composición de IgG enriquecida,en el que al menos una de la primera etapa de precipitación, segunda de precipitación, o tercera etapa de precipitación comprende la adición por pulverización del alcohol.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que todas de la primera etapa de precipitación, segunda etapa de precipitación, y tercera etapa de precipitación comprenden la adición por pulverización del alcohol.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el pH de al menos una de la primera etapa de precipitación, segunda etapa de precipitación, o tercera etapa de precipitación se logra por la adición de una solución modificadora de pH después de la adición del alcohol.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el pH de todas de la primera etapa de precipitación, segunda etapa de precipitación, y tercera etapa de precipitación se logra por la adición de una solución modificadora de pH después de la adición del alcohol.
5. El procedimiento de la reivindicación 3 o 4, en el que la adición de una solución modificadora de pH comprende la adición por pulverización de la solución modificadora de pH.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el pH de la etapa de precipitación se modifica antes y después de la adición de alcohol, durante y después de la adición de alcohol, o antes, durante y después de la adición de alcohol.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el pH de al menos una etapa de precipitación se mantiene durante toda la etapa de precipitación por el ajuste continuo del pH.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el procedimiento comprende además una etapa de purificación de cromatografía de intercambio iónico.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el procedimiento comprende tanto una etapa de purificación de cromatografía de intercambio aniónico como una etapa de purificación de cromatografía de intercambio catiónico.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el procedimiento comprende además una etapa de nanofiltración y/o una etapa de ultrafiltración/diafiltración.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la composición de IgG enriquecida obtenida en la etapa (f) contiene al menos un 85 %, preferentemente al menos un 90 % del contenido en IgG hallado en la fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado usada en la etapa (a).
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la pureza de las γ -globulinas en la composición de IgG final es de al menos aproximadamente un 95 %, preferentemente al menos aproximadamente un 98 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 99 %.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- (a) ajustar el pH de una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado a aproximadamente 7,0;
- (b) ajustar la concentración de etanol de la fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado de la etapa (a) a aproximadamente un 25 % (v/v) a una temperatura de entre aproximadamente -7 °C y aproximadamente -9 °C, formando de este modo una mezcla;
- (c) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (b);
- (d) resuspender el precipitado de la etapa (c) con un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que se ajusta el pH del tampón con entre 300 ml y 700 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una suspensión;
- (e) mezclar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (d) durante al menos aproximadamente 30 minutos;
- (f) filtrar la suspensión con un filtro-prensa, formando de este modo un filtrado;
- (g) lavar el filtro-prensa con al menos 3 volúmenes muertos del filtro-prensa de un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que se ajusta el pH del tampón con entre 50 ml y 200 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una solución de lavado;
- (h) combinar el filtrado de la etapa (f) con la solución de lavado de la etapa (g), formando de este modo una solución, y tratar la solución con un detergente;
- (i) ajustar el pH de la solución de la etapa (h) a aproximadamente 7,0 y añadir etanol hasta una concentración final de aproximadamente un 25 %, formando de este modo un precipitado;
- (j) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (i);
- (k) disolver el precipitado en una solución acuosa que comprende un disolvente o detergente y mantener la solución durante al menos 60 minutos;
- (l) pasar la solución después de la etapa (k) a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico y eluir las proteínas absorbidas en la columna en un eluato;
- (m) pasar el eluato de la etapa (l) a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para generar un efluente;
- (n) pasar el efluente de la etapa (m) a través de un nanofiltro para generar un nanofiltrado;
- (o) pasar el nanofiltrado de la etapa (n) a través de una membrana de ultrafiltración para generar un ultrafiltrado; y
- (p) someter a diafiltración el ultrafiltrado de la etapa (o) frente a un tampón de diafiltración para generar un diafiltrado que tiene una concentración de proteína de entre aproximadamente un 8 % (p/v) y aproximadamente un 12 % (p/v), obteniendo de este modo una composición de IgG concentrada.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que se ajusta la concentración de etanol en al menos una de las etapas (b) y (i) introduciendo etanol en la fracción por pulverización.
15. El procedimiento de la reivindicación 13 o 14, en el que se ajusta el pH al pH apropiado después de la adición de etanol en al menos una de las etapas (b) y (i).
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que se mantiene el pH para toda la reacción de precipitación por el ajuste continuo del pH en al menos una de las etapas (b) y (i).
17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que se ajusta el pH en al menos una etapa pulverizando una solución que puede ajustar el pH.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que se ajusta el pH pulverizando ácido acético glacial.
19. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que el procedimiento comprende además filtrar el diafiltrado a través de un filtro de 0,22 µm o menos.
20. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, en el que el plasma es plasma humano.

21. El procedimiento de una cualquiera de reivindicaciones 13 a 20, en el que la fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado se forma por un procedimiento que comprende las etapas de:
- 5 (i) enfriar una mezcla de donaciones de plasmas combinados hasta una temperatura de entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 10 °C;
- (ii) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (i) por centrifugación;
- 10 (iii) adicionar etanol en el sobrenadante líquido formado en la etapa (ii) hasta una concentración final de etanol entre aproximadamente un 5 % (v/v) y aproximadamente un 10 % (v/v), formando de este modo una mezcla;
- (iv) enfriar la mezcla formada en la etapa (iii) hasta entre aproximadamente -4 °C y aproximadamente 0 °C;
- 15 (v) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (iv) por centrifugación; y aislar el sobrenadante, formando de este modo una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado.
22. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 21, en el que la temperatura de la mezcla de la etapa (b) es aproximadamente -7 °C.
- 20 23. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, en el que el precipitado formado en la etapa (c) se resuspende con entre aproximadamente 12 l y aproximadamente 18 l de tampón por kg de precipitado, preferentemente con aproximadamente 15 l de tampón por kg de precipitado.
- 25 24. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 23, en el que la cantidad de dióxido de silicio añadida a la suspensión en la etapa (e) está entre aproximadamente 0,02 gramos por gramo de precipitado formado en la etapa (c) y aproximadamente 0,06 gramos por gramo de precipitado formado en la etapa (c), preferentemente en el que la cantidad de dióxido de silicio añadida a la suspensión en la etapa (e) es de aproximadamente 0,04 gramos por gramo de precipitado formado en la etapa (c).
- 30 25. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 24, en el que se añade un coadyuvante de filtro a la mezcla antes de la filtración en la etapa (f).
26. El procedimiento de la reivindicación 25, en el que el coadyuvante de filtro es tierra de diatomeas.
- 35 27. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 26, en el que la pureza de las γ -globulinas en el filtrado formado en la etapa (f) es de al menos aproximadamente un 85 %.
28. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 27, en el que el filtrado formado en la etapa (f) contiene menos de aproximadamente 10 mg de fibrinógeno por gramo de proteína total.
- 40 29. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 28, en el que el filtrado formado en la etapa (f) contiene menos de aproximadamente 500 IU de actividad de PKA por gramo de proteína total.
30. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 29, en el que el detergente usado en la etapa (h) comprende polisorbato-80 entre aproximadamente un 0,1 % (p/v) y aproximadamente un 0,3 % (p/v).
- 45 31. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 30, en el que la solución acuosa usada en la etapa (k) comprende Triton-X 100, polisorbato-80 y TNBP.
- 50 32. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 31, en el que se mantiene la solución en la etapa (k) a una temperatura de entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 25 °C.
33. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 32, en el que el nanofiltro de la etapa (n) tiene un tamaño de poro medio de entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 72 nm, preferentemente de entre aproximadamente 19 nm y aproximadamente 35 nm, más preferentemente de aproximadamente 35 nm.
- 55 34. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 33, en el que la membrana de ultrafiltración de la etapa (o) tiene un límite de peso molecular nominal (NMWCO) de aproximadamente 100 kDa o menos.
- 60 35. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 34, en el que la concentración de proteína de la composición es de aproximadamente un 10 % (p/v).
36. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 35, en el que la solución formada en la etapa (h) contiene al menos aproximadamente un 85 %, preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de la IgG presente en la fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado de la etapa (a).
- 65



Cantidad de volúmenes vacíos o muertos del filtro-prensa usados para lavado posterior

Fig. 1

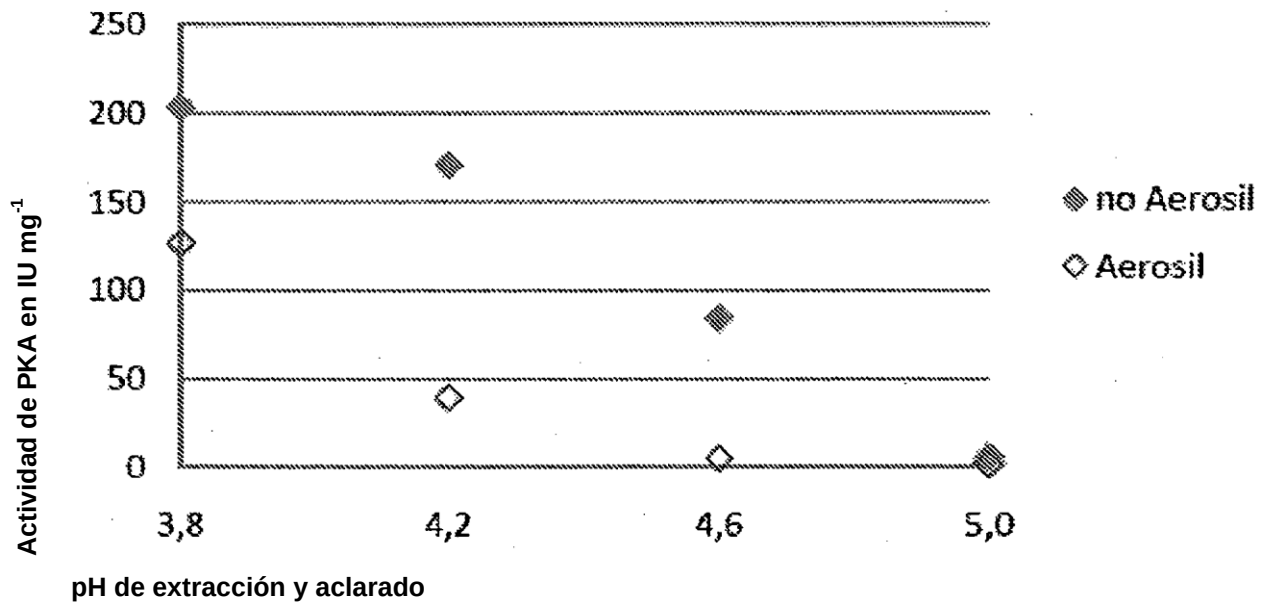


Fig. 2

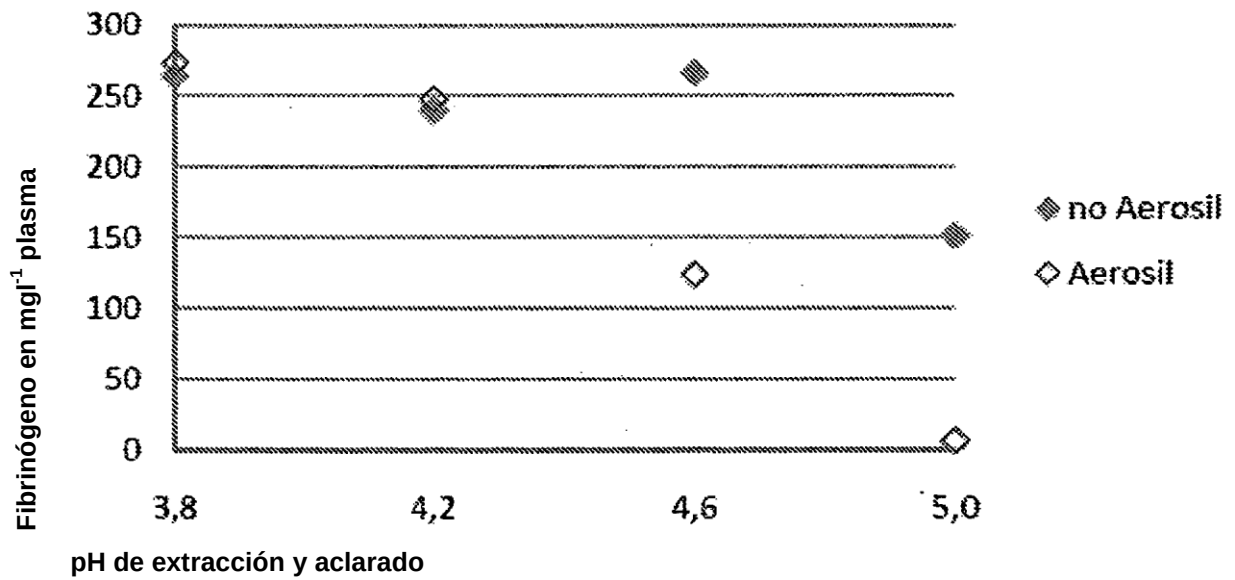


Fig. 3

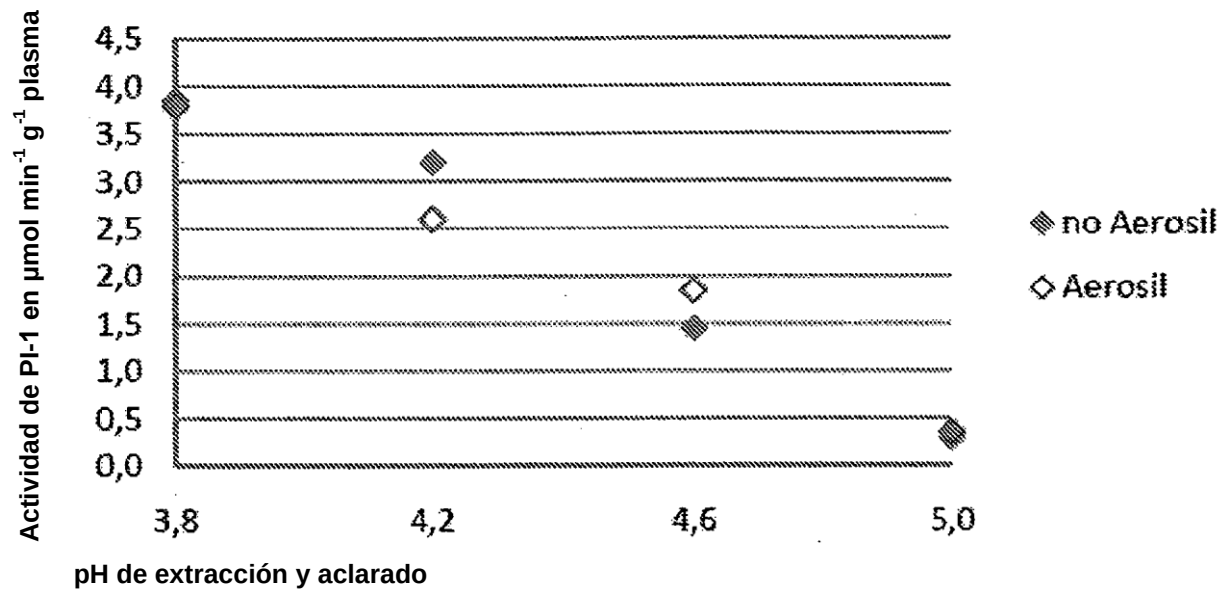


Fig. 4

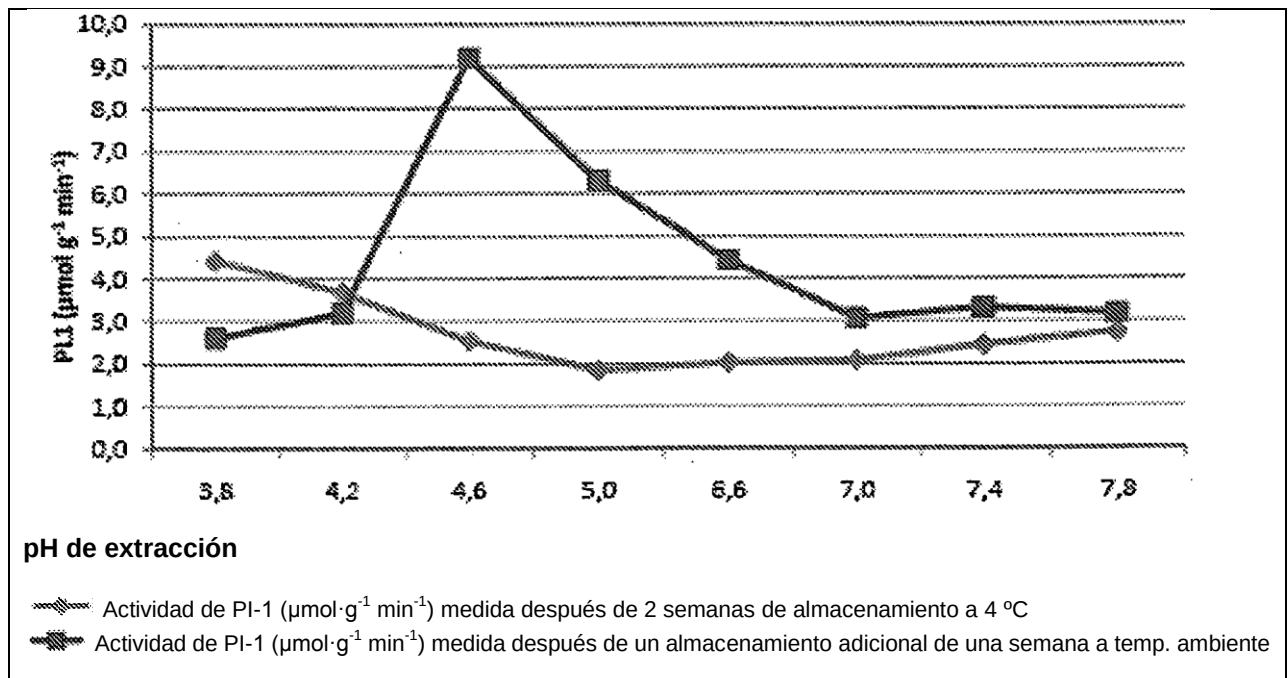


Fig. 5

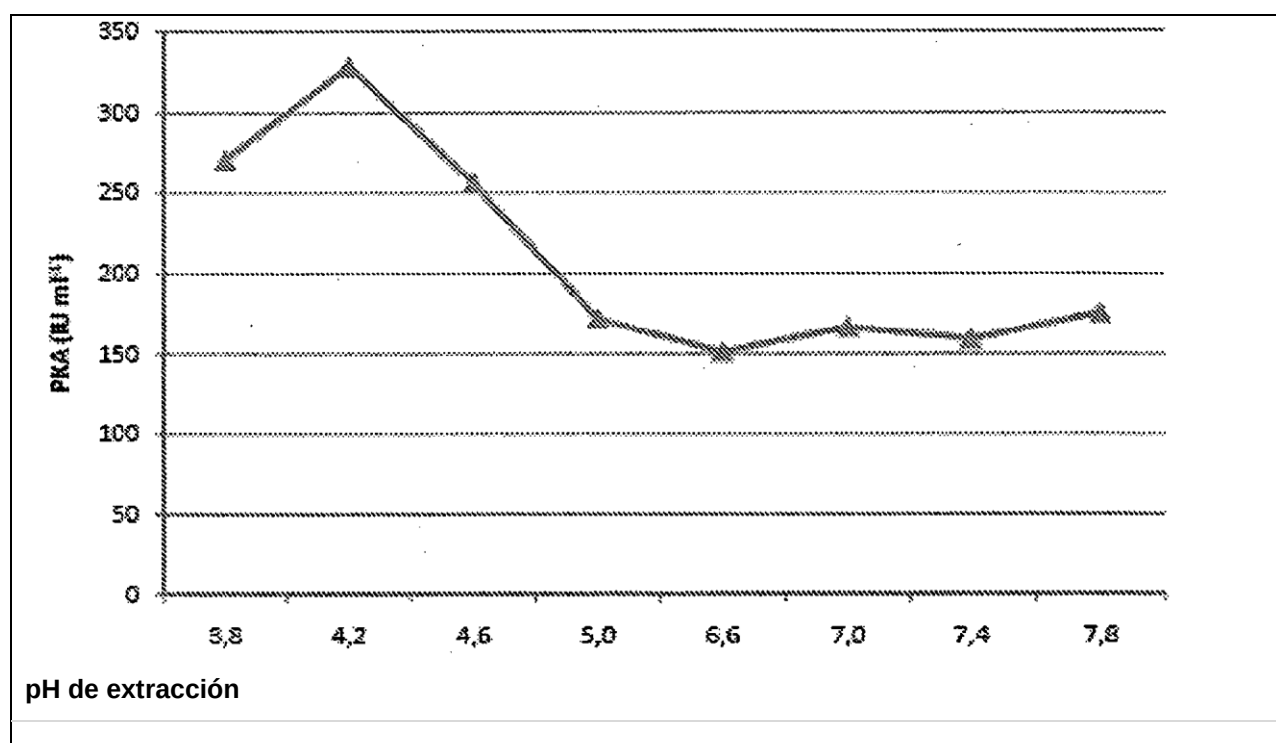


Fig. 6

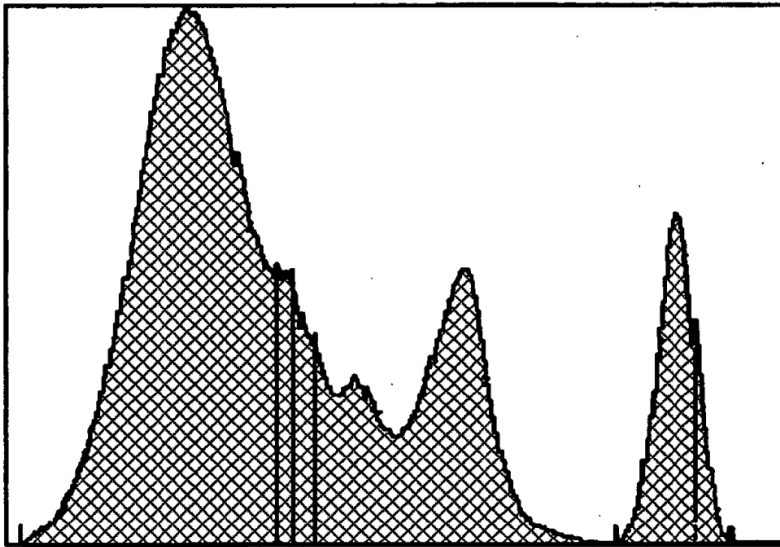


Fig. 7A

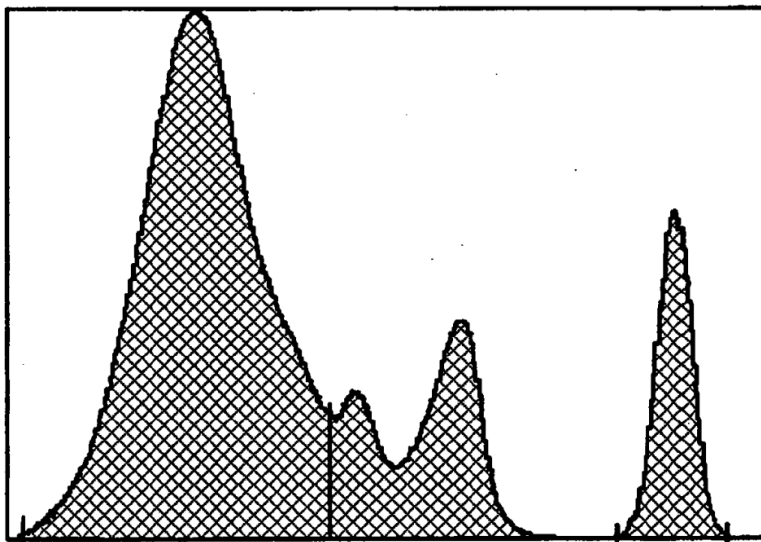


Fig. 7B

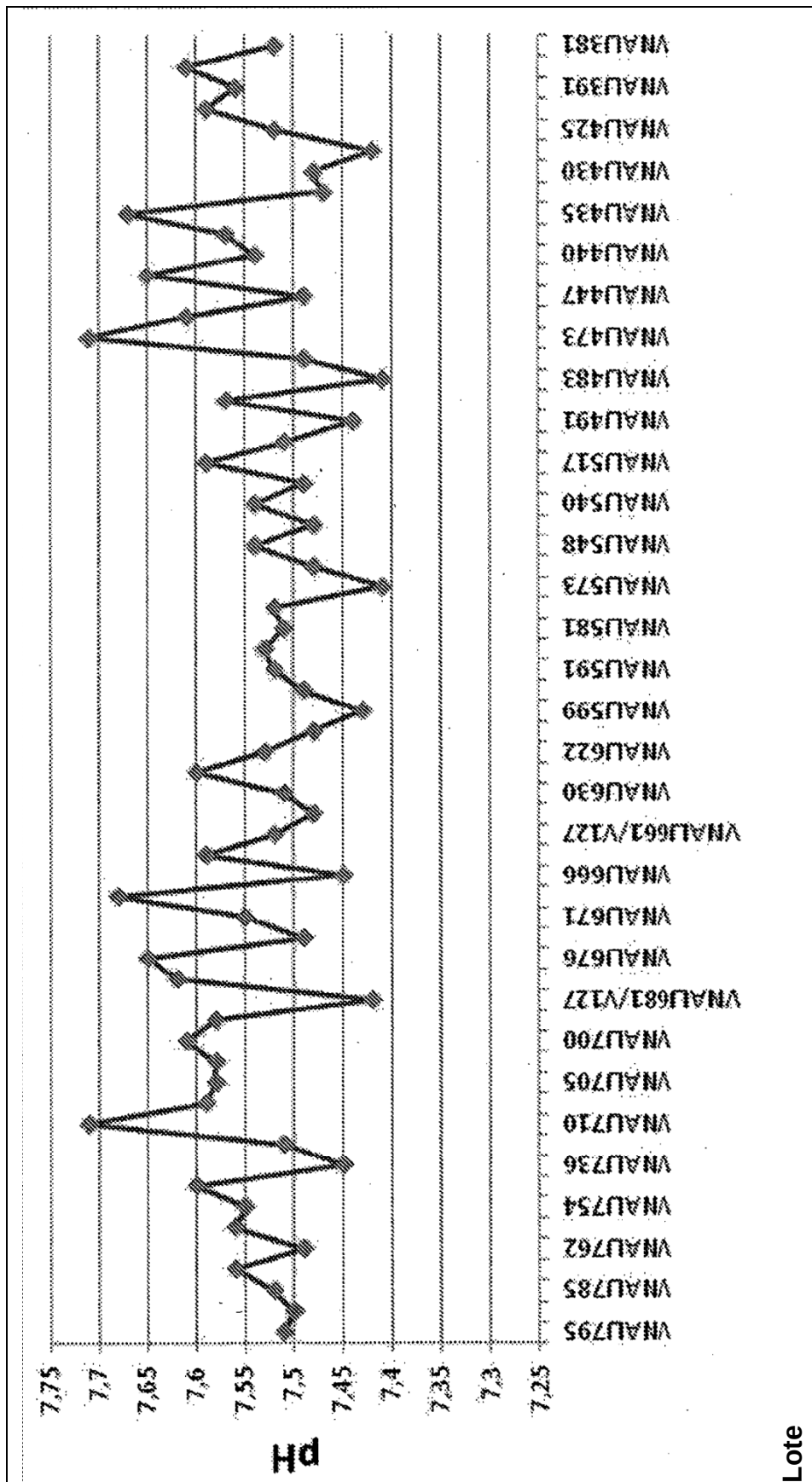


Fig. 8

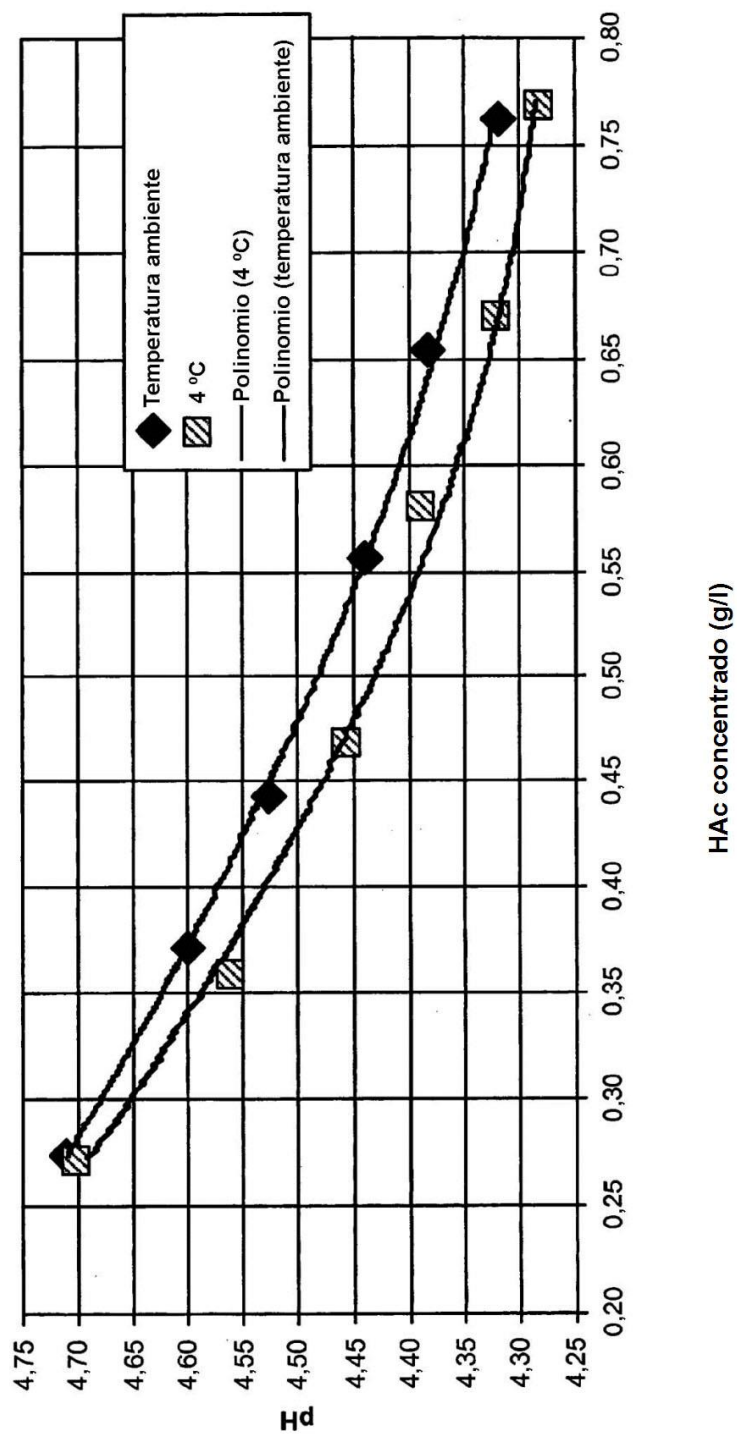


Fig. 9

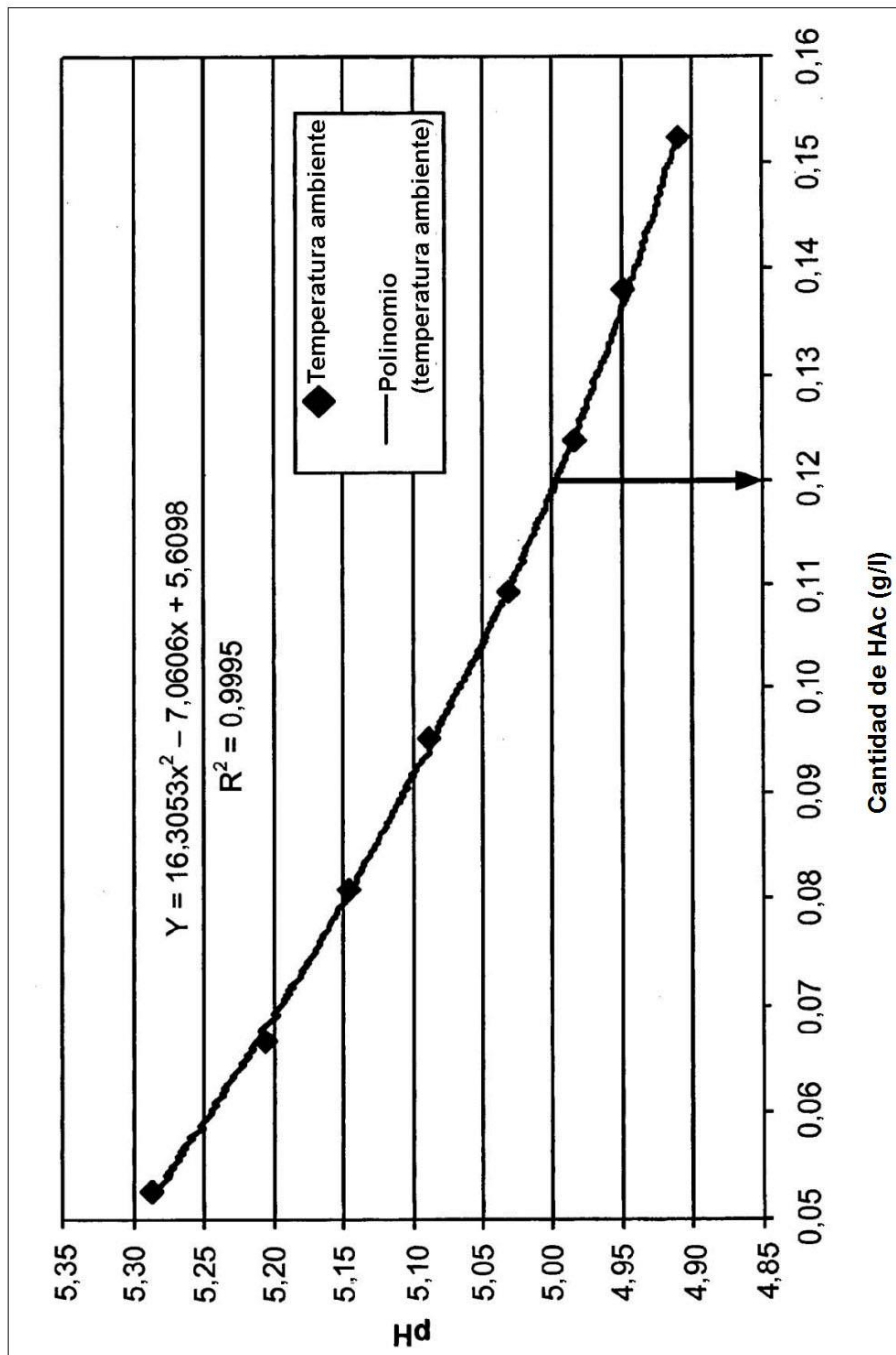


Fig. 10