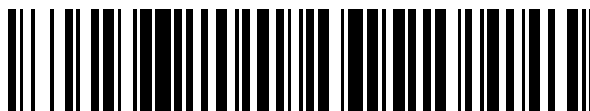


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 420**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2009 E 09803869 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2358391**

54 Título: **Utilización de un concentrado de inmunoglobulinas G (IgG) empobrecido en anticuerpos anti-A y anti-B para el tratamiento de ictericia neonatal por incompatibilidad feto-maternal en sistemas ABO**

30 Prioridad:

17.12.2008 FR 0807105

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

09.02.2015

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
3, Avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis , FR**

72 Inventor/es:

ELZAABI, MAZEN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 528 420 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

Utilización de un concentrado de inmunoglobulinas G (IgG) empobrecido en anticuerpos anti-A y anti-B para el tratamiento de ictericia neonatal por incompatibilidad feto-maternal en sistemas ABO

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a la utilización de un concentrado de inmunoglobulinas G (IgG) empobrecido en anticuerpos anti-A (AcaA) y anti-B (AcaB) para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de ictericia neonatal por incompatibilidad feto-maternal en el sistema ABO.

En la descripción que sigue, las referencias entre corchetes ([]) son relativas a la lista de referencias presentada después de los ejemplos.

10 Estado de la técnica

- La enfermedad hemolítica del recién-nacido (MNH) es una afección del feto o del recién-nacido debida a una incompatibilidad entre los anticuerpos anti-eritrocitarios de la madre y los hematíes del niño. Los anticuerpos anti-eritrocitarios provocan una hemólisis que surge ya en el útero y, según la gravedad del cuadro clínico, una anemia a veces grave en el niño. Al ser la bilirrubina el producto de degradación del hemo (constituyente de la hemoglobina) transportado en la sangre, el cuadro puede ir desde una hiperbilirrubinemia acompañada de ictericia en el niño, hasta una patología muy grave con hidropesía (hydrops foetalis) y que conduce al parto de un niño muerto al nacer. La hiperbilirrubinemia no tratada puede inducir una ictericia nuclear en el recién nacido.

- El conocimiento del cuadro clínico y su exploración diagnóstica es de extrema importancia, tanto más cuanto se dispone hoy día de medios eficaces para prevenir MHN (profilaxis anti-D o factor Rhesus) así como de tratamientos eficaces (exsanguino-transfusión intra-uterina/postnatal, terapia neonatal con UV).

- No obstante, todo esto sólo es posible si el riesgo es reconocido a tiempo, es decir, antes del embarazo (particularmente mediante la determinación del grupo sanguíneo de la madre y, eventualmente, del padre), al comienzo del embarazo (eventualmente por confirmación de los grupos sanguíneos e investigación de aloanticuerpos, comprendidos anticuerpos inmunes anti-A/ anti-B) o en el transcurso del embarazo (control de la evolución del título cada 3 a 4 semanas). Además, la determinación del grupo sanguíneo del padre del niño puede ser muy útil (fenotipo con índices que permiten concluir el genotipo Rhesus probable) ya que entonces es posible deducir el grupo sanguíneo probable del niño.

- El verdadero riesgo de MHN puede ser estimado a partir del grupo sanguíneo de la madre o el bajo tipo de un aloanticuerpo y del grupo sanguíneo presumido del niño, establecido a partir del grupo sanguíneo del padre. Si la madre forma parte de un grupo sanguíneo de riesgo (por ejemplo, O ó Rhesus D negativo), no es necesario en ningún caso renunciar a los controles de la evolución del título.

En casos raros, cuando se da una constelación de riesgos análogos, puede estar indicada la determinación biomolecular del grupo sanguíneo del niño a partir de una biopsia corial.

- 35 La incompatibilidad ABO sobreviene normalmente en el caso de una madre de grupo sanguíneo O y un niño de grupo sanguíneo A o B.

- Los anticuerpos anti-ABO del isotipo IgM, presentes en estado natural, no atraviesan la barrera de la placenta. Aunque el sistema ABO no ha sido todavía completamente desarrollado y expresado en el nacimiento -la determinación definitiva de los grupos sanguíneos no debe efectuarse antes de la edad de 6 meses del niño- el grupo A o B puede ser detectado en los eritrocitos del feto en un estado precoz del embarazo. Este es el motivo por el que la inmunización de la madre es relativamente frecuente incluso en esta constelación. Por otra parte, los anticuerpos inmunes IgG anti-A y anti-B pueden ser inducidos por proteínas ajenas, independientemente de un embarazo o una transfusión sanguínea anterior. No obstante, los anticuerpos IgG anti-A o anti-B tienen casi siempre un poder hemolítico inferior a los anticuerpos análogos en el caso de incompatibilidad Rhesus. Como consecuencia, la evolución de la MHN es más discreta.

- 45 La ictericia aparece en un 70% de los casos entre 24 y 72 horas después del nacimiento. En todos los casos es detectada por vía visual e instrumental, a menudo antes de la recepción del resultado de sangre del cordón, justificando el inicio satisfactorio de la fototerapia. En ningún caso el conocimiento precoz de los resultados conduce a una medida terapéutica, preventiva o curativa en tanto no se haya establecido el diagnóstico de la ictericia. Como máximo conduce a un control aumentado sobre la coloración del recién nacido.

- 50 La ictericia es de forma destacada el más frecuente de los síntomas observados en el periodo neonatal.

La primera característica es que, contrariamente al adulto, la ictericia del recién nacido es, en la inmensa mayoría de los casos, con bilirrubina (BR) indirecta.

Este pigmento, al acumularse en el organismo, afectará a todos los órganos, pero sobre todo el hígado (que, por

delante de los demás, da cuenta de esta acumulación), la sangre (que traslada y almacena en parte el pigmento), la piel y el cerebro, con un riesgo potencial constante de encefalopatía bilirrubínica, que justifica el mayor rigor en la realización del diagnóstico y el tratamiento.

5 Tradicionalmente, los niños son tratados por medio de inmunoglobulinas intravenosas (IGIV) y una fototerapia y, en los casos más graves, mediante transfusión de intercambio.

10 Determinados estudios han llevado al tratamiento de recién nacidos afectados por la enfermedad hemolítica de incompatibilidad de Rh y/o ABO por medio de fuertes dosis de IGIV (inmunoglobulinas intravenosas), y han mostrado que la administración de IGIV reducía el número de niños que tienen necesidad de transfusiones de intercambios, así como la duración del tratamiento por fototerapia (Gottstein et al. (2003), Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition; vol. 88, nº 1, p. F6-F10 [2]).

Se ha mostrado igualmente que la terapia de recién nacidos afectados por la enfermedad hemolítica con incompatibilidad de Rh y/o ABO por medio de dosis elevadas de IGIV reduce la hemólisis, los niveles de bilirrubina en suero y la necesidad de practicar transfusiones por intercambio (Alplay et al. (1999), Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics; vol. 88, nº 2, p. 216-219 [3]).

15 No obstante, un estudio ha mostrado que la administración de IGIV a recién nacidos afectados de ictericia hemolítica isoimmune debida a incompatibilidades de Rh y ABO llevaba a resultados significativamente mejores para el tratamiento de isoimmunización Rh con respecto a la isoimmunización ABO. En efecto, la necesidades de trasfusión de intercambio de los recién nacidos que presentan una hiperbilirrubinemia debida a una incompatibilidad de Rh resultaba disminuida al final de un tratamiento de IGIV con respecto a un tratamiento por fototerapia. Por el contrario, 20 en el caso de recién nacidos que presentan una incompatibilidad ABO, la fototerapia y la administración IVIG no mostraron ninguna diferencia en términos de resultados (Nasserí et al. (2006) Saudi Med J.; 27(12): 1827-30 [4]).

25 El documento de Tanyer G. et al. («Multiple dose IVIG treatment in neonatal immune hemolytic jaundice». Journal of tropical pediatrics Feb 2001, vol. 47, nº 1, páginas 50-53) describe la utilización de IVIG en el tratamiento de la enfermedad hemolítica isoimmune debida a incompatibilidad ABO. No obstante, este documento no describe ninguna característica de las IGIV utilizadas, ni ningún método de preparación que pueda ser utilizado para su obtención. Todos los grupos de pacientes tratados recibieron un tratamiento complementario por fototerapia antes del tratamiento con los concentrados de IGIV, habiendo permitido este tratamiento la disminución del nivel de bilirrubina para conseguir el límite de seguridad. Por tanto, el efecto terapéutico es debido en parte a esta fototerapia. Además, el tratamiento mediante simple dosis administrada es un fracaso, como lo muestra la gran variabilidad de la 30 respuesta obtenida. Ahora bien, el tratamiento mediante dosis múltiples implica las mismas IGIV que las de dosis única. La mejora de la respuesta observada en el caso de una administración de dosis múltiples por tanto es debida únicamente a la posología de administración y no a ninguna técnica de las IGIV como tales. Finalmente, los grupos ensayados debieron ser sometidos a pesar de todo a intercambios de transfusiones, lo que demuestra que este tratamiento no es «éxito terapéutico».

35 Además, la administración de dosis elevadas de IGIV debe ser considerada como un tratamiento de riesgo en ciertos pacientes que presentan una incompatibilidad de ABO. En efecto, las IGIV son concentrados de inmunoglobulinas procedentes de plasma humano y a este respecto comprenden anticuerpos anti-A y anticuerpos anti-B. Numerosas publicaciones científicas indican que la inyección de inmunoglobulinas G (IgG) obtenidas mediante las técnicas de fraccionamiento clásicas, como precipitación en etanol o precipitación por ácido octanoico 40 (Steinbuch et al. (1969) Rev. Franc. Et. Clin, et Biol., XIV, 1054 [5]), pueden provocar hemólisis accidentales, algunas de ellas graves, en los pacientes en tratamiento. Se pueden citar como ejemplo las publicaciones de Buchta C. et al, Biologicals, 33, 2005, 41- 48 ([6]), Wilson J. R. et al, Muscle & Nerve, 29(9), 1997, 1142- 1145 ([7]), Copelan E.A et al, Transfusion, 26, 1986, 410-412 ([8]) et Misbah S.A et al, Drug Safety, 9, 1993, 254-262 ([9]). Un estudio de los efectos de estas IgG sobre la sangre de pacientes que presentan hemólisis, practicados en particular mediante el 45 ensayo de Coombs directo (DCT) mostró que los hematíes están cubiertos por inmunoglobulinas dirigidas contra antígenos A, B o D presentes en su superficie, provocando así su hemólisis.

Este es el motivo por el que las IgG actualmente disponibles en el comercio se obtienen a partir de plasmas seleccionados para evitar la presencia de títulos elevados en anti-A o anti-B.

50 Según la Farmacopea Europea (método 2.6.20 también denominado ensayo de Coombs indirecto (ICT), 1997), las IGIV no deben presentar aglutinación de glóbulos rojos A o B en el ensayo de Coombs indirecto (ICT) in vitro a una dilución 1/64 realizados con una solución de IgG con una concentración inicial llevada a 30 g/l. Dicho de otro modo, el título máximo autorizado por la Farmacopea Europea debe ser inferior a 64 (en valor inverso de la dilución) conforme al método 2.6.20 de la Farmacopea Europea, es decir, que una composición de IGIV diluida a 1/64 no debe provocar la aglutinación de glóbulos rojos (hematíes).

55 Los resultados negativos en el ensayo ICT, es decir, una ausencia de aglutinación de hematíes en presencia de soluciones de IGIV cuyas diluciones son inferiores a la dilución 1/64, según la Farmacopea Europea, demuestran un nivel bajo de anticuerpos anti-A y anti-B aceptados por éstas. No obstante, incluso con concentrados de IgG que proporcionan un resultado negativo al ensayo prescrito por la Farmacopea Europea, es decir, aquellos cuya dilución

es inferior a 1/64, los riesgos de reacciones hemolíticas no pueden ser excluidos ([6]).

Además, las Farmacopeas Americana y Japonesa no contienen ninguna disposición sobre la necesidad de controlar los contenidos residuales de anticuerpos anti-A y anti-B.

5 Los anticuerpos anti-A y anti-B son parcialmente eliminados en el transcurso de la preparación de concentrados de IgG mediante los procedimientos clásicos, como el fraccionamiento etanólico, pero se ha observado un contenido residual que puede ser superior al límite de las normas altas de la Farmacopea Europea. Además, los concentrados preparados según el procedimiento establecido por la solicitante y descritos en la solicitud de patente WO 02/092632 contienen más que los obtenidos mediante el fraccionamiento con etanol. Ciertos lotes de concentrados de IgG pueden presentar contenidos superiores al umbral admitido por la Farmacopea Europea para cada uno de ellos.

10 En consecuencia, parece necesario disponer de un tratamiento de la ictericia neonatal mediante incompatibilidad fetomaternal en el sistema ABO que pueda ser administrado a los recién nacidos que sufren una incompatibilidad ABO, sin riesgo de provocar una hemólisis complementaria.

Descripción de la invención

15 Con este objetivo y en el transcurso de sus importantes investigaciones, la solicitante ha puesto de manifiesto de forma sorprendente que una composición de inmunoglobulinas G que presenta títulos respectivos de anticuerpos anti-A y anti-B conforme a un resultado negativo en el ensayo de Coombs indirecto in vitro, puede ser utilizado para el tratamiento de ictericia neonatal por incompatibilidad fetomaternal en sistemas ABO o de la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad ABO, sin inducir los efectos secundarios no deseables observados con las composiciones de la técnica anterior.

20 Por tanto, la invención se refiere a una composición de inmunoglobulinas G (IgG) de uso terapéutico, que comprende títulos respectivos de anticuerpos anti-A y anti-B según un resultado negativo al ensayo de Coombs indirecto (método 2.6.20 de la Farmacopea Europea), para su utilización en el tratamiento de ictericia neonatal por incompatibilidad fetomaternal en el sistema ABO o de la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad ABO.

25 Se entiende por "inmunoglobulinas G", en el contexto de la presente invención, las IgG policlonales, que pueden ser obtenidas a partir del plasma sanguíneo o de una fracción de plasma sanguíneo ya enriquecida en IgG. Las composiciones o concentrados de IgG de uso terapéutico presentan ventajosamente concentraciones de IgG comúnmente utilizadas, comprendidas preferentemente entre 50 g/l y 100 g/l.

30 Se entiende "uso terapéutico", en el contexto de la presente invención, una utilización dirigida a la mejora del estado de salud del paciente, por ejemplo, la disminución de la virulencia de la ictericia, o incluso su desaparición total o parcial, o incluso la curación del paciente.

35 Se entiende por "títulos respectivos de anticuerpos anti-A y anti-B", en el contexto de la presente invención, el título como se define por la Farmacopea Europea (Farmacopea Europea 2.6.20) y medido mediante el ensayo de Coombs indirecto (ensayo ICT). Dicho de otro modo, el título es la dilución a partir de la cual se detecta una aglutinación según el método 2.6.20 de la Farmacopea Europea. Incluso dicho de otro modo, el título es la dilución a partir de la cual se observa una hemólisis.

40 El ensayo ICT (método 2.6.20 de la Farmacopea Europea) consiste en una suspensión de hematíes puestos en contacto con la composición de IgG utilizada para la invención, una solución de anticuerpos (antiglobulinas) dirigidos contra los restos de IgG humanos. Estos anticuerpos se fijan sobre los anticuerpos anti-A o anti-B asociados a los hematíes permitiendo así su aglutinación mediante la formación de puentes entre las IgG. El ensayo de investigación de anticuerpos anti-A o anti-B se inspira directamente en este ensayo clásico de serología hematológica (ensayo de Coombs indirecto). En el marco de la invención, el método 2.6.20 de la Farmacopea Europea puede ser realizado de la manera siguiente:

45 se preparan dos series idénticas de diluciones de la composición IgG utilizada para la invención en una solución de cloruro de sodio R a 9 g/l. A cada dilución de la primera serie se añade un volumen igual de una suspensión al 5% v/v de glóbulos rojos A lavados 3 veces previamente con la solución de cloruro de sodio. A cada dilución de la segunda serie se añade un volumen igual de una suspensión al 5% v/v de glóbulos rojos B lavados 3 veces previamente con la solución de cloruro de sodio. Se deja incubar la suspensión a 37°C durante 30 minutos, seguidamente se lavan las células con la solución de cloruro de sodio. Cada suspensión se pone en contacto con reactivo de antiglobulina humana polivalente durante 30 minutos. Sin centrifugar las mezclas, se investiga mediante examen microscópico una eventual aglutinación. Si la composición de IgG antes de la dilución tiene un contenido de inmunoglobulinas superior a 30 g/l, se debe efectuar una dilución para alcanzar esta concentración de 30 g/l antes de preparar las diluciones que van a ser utilizadas en el ensayo. Las diluciones de 1/64 no presentan indicios de aglutinación.

55 Cuando el nivel de anticuerpos anti-A y anti-B es muy bajo en los concentrados de IgG, el ensayo ICT es negativo, más aún en las condiciones de la Farmacopea Europea, dado que las reacciones de aglutinación de hematíes ya no

tienen lugar, incluso con la adición de anticuerpos anti-IgG humanos, ya que la densidad de anticuerpos anti-A y anti-B es demasiado baja para el establecimiento de puentes entre los hematíes mediante los enlaces de los anticuerpos anti-A y anti-B fijados sobre hematíes y los anticuerpos anti-IgG humanos.

5 El ensayo de la Farmacopea Europea 2.6.20, o ensayo ICT, es el único ensayo reconocido a nivel reglamentario, y todas las IGIV comercializadas en Europa deben adaptarse a este ensayo, es decir, presenta una ausencia de aglutinación a una dilución de 1/64. El título máximo autorizado por la Farmacopea debe ser inferior por tanto (en valor inverso de la dilución) a 64 (<64). Es decir, que a una dilución de 1/64, el producto ensayado no induce aglutinación, conforme a lo que se describe en el método 2.6.20 de la Farmacopea Europea.

10 Se entiende por "resultado negativo en el ensayo de Coombs indirecto", en el contexto de la presente invención, una ausencia de aglutinación de los hematíes, medida según el método 2.6.20 de la Farmacopea Europea, durante su puesta en contacto con las IgG de la composición utilizada para la invención en presencia de antiglobulina humana polivalente.

15 La composición de inmunoglobulinas G utilizada para la invención puede presentar por tanto, de forma ventajosa, títulos respectivos de anticuerpos anti-A y anti-B conformes a un resultado negativo del ensayo de Coombs indirecto in vitro de 64 del valor inverso de la dilución, es decir, negativos a una dilución 1/64.

20 La composición de inmunoglobulinas G utilizada para la invención presenta ventajosamente un título (en valor inverso de la dilución) comprendido entre 0, estando ventajosamente excluido el valor 0, y 8. A estos títulos de anticuerpos anti-A y anti-B, la composición de IgG utilizada para la invención presenta un resultado conforme a la ICT, es decir, una ausencia de aglutinación. Es decir, que a una dilución comprendida entre 0 (ninguna dilución), estando ventajosamente excluido el 0, y 1/8, la composición de IgG utilizada para la invención no induce una aglutinación, conforme a lo que se describe en el método 2.6.20 de la Farmacopea Europea. Por tanto, un título de 8 significa que se observa una aglutinación más allá de la 8ª dilución de la muestra (dilución de 1/8). Un título de 0 significa que no se detecta ninguna aglutinación, incluso cuando la muestra no es diluida.

25 Ventajosamente, el título de anticuerpos anti-A y anticuerpos anti-B, proporcionado en valor inverso de la dilución, es inferior a 4, o inferior a 2. Estas composiciones de IgG no provocan una aglutinación cuando son diluidas respectivamente 4 veces (dilución de 1/4) o 2 veces (dilución de 1/2).

30 Por tanto, las composiciones (o concentrados) de IgG que permiten realizar la invención presentan títulos de anticuerpos anti-A y anti-B netamente inferiores a los observados en los concentrados de IgG estándar, es decir, los obtenidos mediante fraccionamiento etanólico y/o mediante la realización de las técnicas de purificación que asocian cromatografías sin una etapa complementaria de eliminación de los anticuerpos considerados.

Además, los títulos son netamente inferiores a los umbrales aceptados por la Farmacopea Europea, lo que limita muy significativamente los riesgos de hemólisis en ciertos receptores del tratamiento. La realización del ensayo de Coombs indirecto, con composiciones de IgG utilizadas para la invención, puede conducir a resultados negativos, incluso con muestras de IgG como tales, no diluidas.

35 Los concentrados de IgG utilizados para la invención por tanto se definen por una ausencia notable de los principios activos de anticuerpos anti-A y anti-B que son dirigidos contra los epitopos presentes en los glóbulos rojos.

La solicitante ha encontrado que una composición de IgG como la descrita está particularmente adaptada para el tratamiento de ictericia neonatal por incompatibilidad fetomaternal en el sistema ABO.

40 Ventajosamente, la composición de inmunoglobulinas G utilizada para la invención puede presentar por tanto, de forma ventajosa, títulos respectivos de anticuerpos anti-A y anti-B iguales a 64 en valor inverso de la dilución, o comprendidos entre 0 y 8, o inferiores a 4, por ejemplo, inferiores a 2. Ventajosamente, en los casos indicados, el ensayo de Coombs se lleva a cabo con una solución de IgG con una concentración inicial llevada a 30 g/l.

45 Se entiende por "ictericia neonatal por incompatibilidad fetomaternal en el sistema ABO", en el contexto de la presente invención, un amarilleo que acompaña a la enfermedad hemolítica del recién nacido (MHN) por incompatibilidad ABO (denominada también enfermedad hemolítica ABO, enfermedad hemolítica neonatal con incompatibilidad ABO o ictericia hemolítica isoimmune debida a una incompatibilidad ABO). Esta ictericia es debida a una acumulación de bilirrubina en varios órganos, siendo la bilirrubina el producto de degradación del hemo transportado por la sangre.

50 Más particularmente, los pacientes a los cuales puede ser suministrada la composición de IgG descrita pueden ser recién nacidos prematuros o recién nacidos nacidos a término, por ejemplo, desde el nacimiento hasta el día 28º después del nacimiento. Estos bebés presentan generalmente una hiperbilirrubinemia debida a la enfermedad hemolítica ABO, son positivos a un ensayo neonatal de antiglobulina (ensayo de Coombs indirecto) y presentan un índice elevado de reticulocitos (superior o igual a 10%). Estos bebés pueden ser niños o niñas.

55 La composición utilizada para la invención puede ser igualmente utilizada por tanto como un medicamento para el tratamiento de la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad ABO.

Las composiciones de IgG, o concentrados de IgG, como se definen con anterioridad, pueden presentar un contenido muy bajo de IgG poli-reactivas, que puede estar comprendido, por ejemplo, entre 0,01% y 0,1%, en particular entre 0,07 y 0,1%. En este contexto, el contenido de IgG poli-reactivas significa un porcentaje en moles o peso. Este contenido se determina mediante los métodos descritos por la solicitante en la solicitud de patente EP 1.059.088.

Por ejemplo, la composición de inmunoglobulinas G utilizada para la invención puede presentar, de forma ventajosa, títulos respectivos de anticuerpos anti-A y anti-B de 64 en valor inverso de la dilución, o comprendidos entre 0 y 8 o inferiores a 4, por ejemplo, inferiores a 2, siendo realizado el ensayo de Coombs con una solución de IgG de concentración inicial llevada a 30 g/l, un contenido de IgG poli-reactivas que puede estar comprendido, por ejemplo, entre 0,01% y 0,1%, en particular entre 0,07 y 0,1%.

Se entiende por "IgG poli-reactivas", en el contexto de la presente invención, una fracción de IgG contenida en la composición de IgG como se definió anteriormente, correspondiente a la suma de los anticuerpos naturales que no resultan de una inmunización deliberada y que experimenta afinidades variables para los antígenos propios, anticuerpos anti-idiotípicos (es decir, dirigidos contra la región variable de otros anticuerpos) y anticuerpos hechos poli-reactivos a continuación de los tratamientos recibidos durante las diferentes etapas del procedimiento de purificación de la composición de IgG anteriormente definida. Ventajosamente, la composición de IgG utilizada en la invención se distingue de las composiciones de otras composiciones de IgG disponibles en el comercio por la casi ausencia de poli-reactividad. Por tanto, la solicitante ha descubierto de forma completamente sorprendente que esta casi ausencia de poli-reactividad de las composiciones de IgG, combinada con niveles de anticuerpos anti-A y anti-B muy bajos de estas composiciones, es una característica importante para el tratamiento de la ictericia neonatal por incompatibilidad fetomaternal en el sistema ABO o de la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad ABO. Por tanto, la composición de IgG utilizada en la invención es eficaz como medicamento para el tratamiento de la ictericia neonatal por incompatibilidad fetomaternal en el sistema ABO o de la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad ABO, evitando siempre las reacciones no deseables con respecto a los hematíes (particularmente por el empobrecimiento de anticuerpos anti-A y anti-B) y reduciendo las reacciones secundarias no deseables que resultan de la presencia de IgG poli-reactivas (particularmente fiebres, náuseas o cefaleas).

La composición utilizada para la invención puede comprender además uno o varios estabilizantes.

Se entiende por "estabilizante", en el contexto de la presente invención, un compuesto que permite la conservación de la composición de IgG a lo largo del tiempo. El estabilizante puede permitir particularmente la conservación de la composición de IgG por un periodo indefinido. Además, el estabilizante es ventajosamente compatible con un uso terapéutico.

El estabilizante puede ser ventajosamente uno de los desarrollados por la solicitante en su solicitud de patente WO 2004/091656, a saber, una mezcla de un azúcar alcohólico, preferentemente manitol, sorbitol o sus isómeros, glicina y un detergente no iónico, como Tween® 80, Tween® 20, Triton® X100 o Pluronic® F68, siendo estos tres compuestos aceptables en el campo farmacéutico.

Las concentraciones finales de manitol en la composición de IgG pueden estar comprendidas entre 30 g/l y 50 g/l ppm, y las de glicina entre 7 g/l y 10 g/l. Las concentraciones de estos compuestos representan las concentraciones finales en las composiciones de IgG.

Ventajosamente, las concentraciones de la formulación se determinaron por la solicitante para estabilizar las formas líquidas y/o liofilizadas.

La composición utilizada para la invención puede ser administrada por vía intravenosa o por vía subcutánea. A estos fines, los concentrados de IgG según la invención deben estar exentos de virus, por ejemplo, mediante un tratamiento clásico de disolvente-detergente conocido en la técnica anterior utilizando, por ejemplo, una mezcla de Tween® 80/ TnBP o Triton® X100/ TnBP y/o realizar etapas de filtración para eliminar finalmente los virus y/o otras macromoléculas que no hubieran sido eliminadas mediante el tratamiento virucida de disolvente-detergente, como el prion, agente responsable de las encefalopatías espongiiformes transmisibles.

Los concentrados de IgG utilizados para la invención pueden ser sometidos igualmente a una etapa de nanofiltración.

La composición utilizada para la invención puede ser formulada de forma que se presente en forma líquida o liofilizada en presencia de estabilizantes apropiados y será almacenada a la espera de una utilización posterior.

Ventajosamente, la composición es inyectable por vía intravenosa.

En este modo de realización, la composición utilizada para la invención puede ser una solución para inyección, por ejemplo, una solución de inmunoglobulina humana normal para inyección para una utilización intravenosa a 5 g/100 ml (5%).

Ventajosamente, la solución para inyección puede ser dosificada a una 1 g/100 ml (1%), a 2 g/100 ml (2%) o a 3 g/100 ml (3%) o a 4 g/100 ml (4%) o a 5 g/100 ml (5%).

Ventajosamente, las dosis de IgG de la solución inyectable pueden estar comprendidas entre 1 g/100 ml y 5 g/100 ml o entre 2 g/100 ml y 5 g/100 ml, entre 3 g/100 ml y 5 g/100 ml o igual a 5 g/100 ml.

- 5 La composición que permite realizar la invención puede ser administrada de forma simultánea o consecutiva a un tratamiento por fototerapia, por ejemplo, a una cantidad comprendida entre 500 mg/kg y 2000 mg/kg. Es posible comenzar por una administración de 500 mg/kg y seguidamente, si el nivel de bilirrubina no disminuye (lo que puede ser ensayado mediante un ensayo conocido de bilirrubinemia), aumentar la dosis por etapas de 500 mg/kg hasta una normalización del nivel de bilirrubina. Esta administración puede ser repetida.
- 10 La composición que permite realizar la invención puede ser administrada sin fototerapia paralela. La cantidad administrada puede estar comprendida entre 500 mg/kg y 2000 mg/kg. Es posible comenzar por una administración de 500 mg/kg y seguidamente, si el nivel de bilirrubina no disminuye (lo que puede ser ensayado mediante un ensayo conocido de bilirrubinemia), aumentar la dosis por etapas de 500 mg/kg hasta una normalización del nivel de bilirrubina. Esta administración puede ser repetida.
- 15 Una composición adaptada a la realización de la invención puede ser igual a la descrita en el documento WO 2007/077365.

La composición de IgG puede ser obtenida mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica.

Particularmente, la composición puede ser obtenida mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:

- 20 a) preparación de una composición de IgG por fraccionamiento etanólico y/o por separación cromatográfica, que comprende una etapa de inactivación viral,
- b) cromatografía de inmunoafinidad por percolación de la composición de IgG sobre una mezcla de soportes cuyas matrices están injertadas con grupos de oligosacáridos antigénicos similares a los grupos sanguíneos A y B, y
- c) filtración de eliminación de virus y/o partículas de tamaño superior a 20 nm.
- 25 Ventajosamente, un procedimiento así se describe en el documento WO 2007/077365.

Este procedimiento se puede llevar a cabo muy ventajosamente a escala industrial. Además, la combinación de etapas conducentes a la preparación de composiciones de IgG y una etapa específica de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B permite obtener una composición de IgG, de uso terapéutico, que comprende además, preferentemente, un nivel de IgG poli-reactivas inferior a 0,1% con respecto al contenido total IgG. Adicionalmente,

30 esta composición comprende un título de AcaA y AcaB no deseables bastante inferior al valor límite de base del ensayo descrito en la Farmacopea Europea, es decir, inferior a 64 (en valor inverso de la dilución) e incluso proporcionando un resultado negativo mediante la realización del ensayo ICT con estas muestras no diluidas, es decir, un título igual a 0.

- 35 Preferentemente, la etapa a) del procedimiento puede ser en sí misma un procedimiento de obtención de concentrados de IgG, como los que son bien conocidos por un experto en la técnica. Se trata de un fraccionamiento etanólico desarrollado por Cohn et al. (Cohn et al. 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459 ; Oncley et al. 1949, J. Am. Chem. Soc. 71, 541 [11]) o bien de una separación cromatográfica como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0.703.922 y WO 99/64462. Se prefieren muy particularmente los procedimientos desarrollados por la solicitante en las solicitudes de patentes WO 94/29334 y WO 02/092632 y, muy particularmente, el descrito en el
- 40 documento WO 02/092632. En este caso, la etapa a) del procedimiento de la invención comprende una purificación previa por precipitación de contaminantes lípidos a partir de un plasma sanguíneo o de una fracción de plasma sanguíneo enriquecido en IgG, una cromatografía única sobre un soporte de resina de intercambio de aniones efectuada a pH alcalino, una elución selectiva de las IgG mediante una etapa por un tampón apropiado a un pH comprendido entre 4 y 7.

- 45 Se entiende por "contaminantes lípidos", en el contexto de la presente invención, los constituyentes del plasma distintos de las inmunoglobulinas.

Se entiende por "fracción de plasma sanguíneo enriquecido en IgG", en el contexto de la presente invención, una fracción de plasma que ya ha sido sometida a etapas de purificación, de forma que se aumente la concentración de IgG en esta fracción.

- 50 Se entiende por "cromatografía única", en el contexto de la presente invención, una etapa de cromatografía no repetida posteriormente.

Se entiende por "elución selectiva de las IgG en una etapa", en el contexto de la presente invención, una etapa de elución que permite eluir la mayor parte de las inmunoglobulinas G.

Para los fines de la presente invención, los tampones que permiten la elución selectiva de las IgG en una etapa pueden ser cualquier tampón bien conocido por un experto en la técnica.

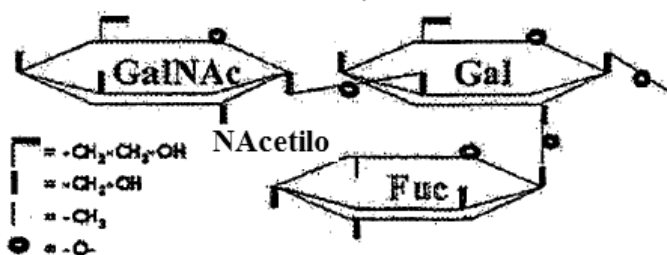
La etapa a) del procedimiento comprende un tratamiento de inactivación viral, efectuado preferentemente mediante un disolvente-detergente, como se describe por Horowitz en la patente US 4.764.369. Se llevará a cabo adecuadamente, en su caso, antes de la etapa cromatográfica posterior que permite eliminar particularmente residuos químicos de este tratamiento.

Este concentrado es sometido seguidamente a una etapa cromatográfica de inmutofinidad sobre una mezcla dos soportes injertados de grupos antigénicamente análogos a los grupos sanguíneos A y B, preferentemente en una columna rellena de esta mezcla de soportes. Preferentemente, el soporte cromatográfico está constituido por una matriz de polímero natural reticulado de tipo de agarosa, sobre la que son injertados separadores o brazos de acoplamiento que están a su vez injertados con oligosacáridos que representan ventajosamente trisacáridos (oligosacáridos) correspondientes a los epitopos de los grupos sanguíneos A y B.

Se entiende por "grupos oligosacáridos antigénicamente similares a los grupos A y B", en el contexto de la presente invención, grupos oligosacáridos reconocidos por los mismos anticuerpos o las mismas inmunoglobulinas que los grupos sanguíneos A y B.

En particular, se obtienen muy buenos resultados utilizando este soporte cuyos trisacáridos, correspondientes al epitopo del grupo sanguíneo A, que presentan la estructura N-acetilgalactosamina (GalNAc) - galactosa (Gal) - Fucosa (Fuc), y los correspondientes al epitopo del grupo sanguíneo B, que presentan la estructura Galactosa - Galactosa - Fucosa. Este soporte representa muy ventajosamente un gel o resina disponible en el comercio bajo la denominación GLYCOSORB ABO®, de la empresa Glycorex Transplantation AS (Suecia).

Como ejemplo, si se utiliza este soporte, el trisacárido correspondiente al epitopo del grupo sanguíneo A presenta la estructura siguiente:

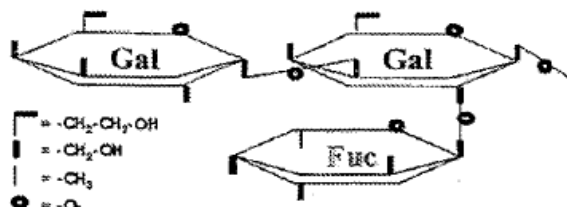


N-acetilgalactosamina (GalNAc)

Galactosa (Gal)

Fucosa (Fuc).

Como ejemplo, si se utiliza este soporte, el trisacárido correspondiente al epitopo del grupo sanguíneo B presenta la estructura siguiente:



Se entiende por "soporte", en el contexto de la presente invención un material inerte que sirve para soportar la matriz. Ventajosamente, a un soporte es injertada una matriz, que porta un tipo de grupos funcionales a saber, un tipo de grupos oligosacáridos.

Estos soportes son bien conocidos por un experto en la técnica.

La matriz puede ser cualquier matriz adaptada. Estas matrices son bien conocidas por un experto en la técnica. Se pueden dar particularmente como ejemplo matrices de sefarosa, por ejemplo, GLYCOSORB ABO (Glycorex Transplantation).

Es posible utilizar la matriz GLYCOSORB ABO (Glycorex Transplantation), que está injertada con trisacáridos de los

grupos sanguíneos A y B.

Se entiende por “mezcla de soportes”, en el contexto de la presente invención, la mezcla de soportes de los que algunos portan la matriz injertada con oligosacáridos antigénicamente similares al grupo sanguíneo A y de los que otros portan la matriz injertada con oligosacáridos antigénicamente similares al grupo sanguíneo B.

5 Por tanto, los diferentes tipos de matrices se pueden encontrar en proporciones variables.

Ventajosamente, la mezcla de soportes injertados de los grupos antigénicamente similares al grupo sanguíneo A y al grupo sanguíneo B están en una proporción respectiva comprendida entre 25/75 y 75/25 (v/v). En efecto, es posible ajustar las proporciones de los dos soportes en la columna a la población de donantes según la repartición de los grupos sanguíneos de éstos. En el marco de una utilización habitual, la columna estará rellena preferentemente con una mezcla de 50/50 (v/v) de cada soporte específico siguiente. Se puede utilizar columnas analíticas de 15 a 25 cm de longitud y de 0,5 a 1 cm de diámetro. El caso de una realización a escala piloto se pueden utilizar columnas de 40 a 60 cm de longitud y de 40 a 60 mm de diámetro. En este caso, es posible introducir en la columna 600 ml de soporte de inmunoafinidad.

15 Este soporte puede ser almacenado en NaOH 1 M entre dos ciclos de utilización. Antes de la utilización, se lava con agua.

Se puede introducir seguidamente en la columna cromatográfica de inmunoafinidad concentrado de IgG, preferentemente a una razón de 0,2 a 4 litros y, en particular, de 1 a 2 litros, por mililitro de soporte. La especificidad de este soporte no necesita un acondicionamiento previo de la fracción de IgG, es decir, que puede ser adecuado cualquier fracción o concentrado de IgG obtenido mediante las técnicas de fraccionamiento de plasma la técnica anterior.

20 La percolación del concentrado no requiere la intervención del mecanismo de elución. En consecuencia, cualquiera que sea la forma mediante la cual se obtiene el concentrado de IgG, puede ser percolado a través de la columna, eventualmente gracias a una bomba. Esta percolación permite la retención de los AcaA y AcaB y de las IgG poli-reactivas. Ventajosamente, la columna se lava seguidamente con agua recuperar las IgG todavía presentes en el volumen muerto de la columna.

Después de la percolación del concentrado de IgG, se obtiene una fracción de IgG empobrecido en AcaA y AcaB, así como IgG poli-reactivas procedentes del procedimiento de fabricación. En efecto, los AcaA y AcaB son retenidos sobre su resto antigénico del soporte cromatográfico que modifica la conformación.

30 La afinidad de estas IgG poli-reactivas retenidas de forma secundaria es mucho menos considerable que las de los AcaA y AcaB. Es posible eluir las de forma fraccionada después del paso de las IgG, mediante la utilización de un tampón de elución que contiene, por ejemplo, una sal de metal alcalinotérreo de concentración comprendida entre 0,1 y 1,5 M, a un pH de 3-8,6.

35 La columna cromatográfica y el soporte pueden ser seguidamente lavados con una solución ácida, como de glicina-HCl, pH 2,8, para la desorción de los AcaA y AcaB retenidos sobre el soporte. Este soporte es seguidamente aclarado con agua y tratado con una solución de NaOH 1M.

40 El concentrado de IgG muy empobrecido en AcaA y AcaB es seguidamente sometido a una filtración de eliminación de virus resistentes al tratamiento mediante disolvente-detergente y/o otras partículas de tamaño superior a 20 nm, como los priones, polímeros de IgG producidos durante las etapas de su fabricación, lipopolisacáridos en micelas, ácidos nucleicos y proteínas agregadas. Este tratamiento representa ventajosamente la nanofiltración, realizada mediante filtros de porosidad decreciente de 100 a 15 nm, en particular sobre tres filtros dispuestos en serie y umbrales de retención decreciente de 100, 50 y 20 nm.

Ventajosamente, el procedimiento comprende una etapa de inactivación viral.

45 Se entiende por “inactivación viral”, en el contexto de la presente invención, cualquier método o etapa que permita inactivar, es decir, desnaturalizar de forma eficaz, las partículas virales y todo lo que se refiere a la funcionalidad de las proteínas plasmáticas.

Los métodos de inactivación viral son bien conocidos por un experto en la técnica. Entre estos métodos, una etapa de inactivación viral puede ser escogida entre: etapa de disolvente-detergente, pasteurización.

Ventajosamente, la etapa de inactivación viral puede ser efectuada mediante una etapa de disolvente-detergente.

50 La fracción de IgG así recolectada está ya suficientemente concentrada y puede ser seguidamente sometida a las etapas de concentración complementaria por ultrafiltración y filtración esterilizante.

El procedimiento puede comprender, después de la etapa de b), etapas de concentración por ultrafiltración y filtración esterilizante.

Ventajosamente, la etapa de filtración esterilizante puede ser efectuada mediante nanofiltración.

5 El procedimiento puede comprender, después de la etapa c), una etapa complementaria de adición de estabilizantes con el fin, por una parte, de asegurar la estabilidad de los concentrados de IgG en el transcurso la conservación en el tiempo y, por otra parte, permitir una liofilización que evite la desnaturalización de las IgG en las diversas fases asociadas a la misma. Preferentemente, se añadirá una formulación estabilizante única, farmacéuticamente aceptable, que responda al objetivo de asegurar la estabilización de las dos formas de conservación previstas de las IgG a la vez, a saber, en forma líquida o liofilizada y conservar, o sea, mejorar la eficacia terapéutica de estas IgG, como se describe en la solicitud de patente WO 2004/091656.

10 Las composiciones de IgG son eventualmente sometidas a una etapa posterior de concentración por ultrafiltración y, seguidamente a una filtración esterilizante y pueden ser acondicionadas en frascos y conservadas preferentemente a temperaturas de aproximadamente 4°C.

Puede ser utilizado un método de dosificación para dosificar los anticuerpos anti-A y anti-B de la composición de IgG descrita en la presente invención.

15 Este método de dosificación de los anticuerpos anti-A y/o anti-B en los concentrados de IgG puede comprender las etapas consistentes en:

a) preparar y calibrar una suspensión de hematíes del grupo sanguíneo O Rhesus +,

b) preparar soluciones de anticuerpos anti-D monoclonales en un intervalo de concentraciones de 0 a 200 ng/ml en un tampón biológicamente aceptable,

20 c) poner en contacto dichos hematíes con una solución de anticuerpos anti-D monoclonales e incubar las mezclas de hematíes así obtenidas durante un periodo predeterminado,

d) añadir a cada mezcla de hematíes un fragmento de anticuerpos anti-IgG humanos F(ab')₂ marcados por medio de un fluorocromo e incubar dichos hematíes,

e) someter cada mezcla de hematíes obtenida en la etapa d) a una citometría de flujo,

25 f) elaborar una curva de calibración de la concentración de anticuerpos monoclonales anti-D en función de la fluorescencia.

Seguidamente es posible dosificar los anticuerpos anti-A y anti-B realizando el método siguiente:

a) preparar y calibrar una suspensión de hematíes del grupo sanguíneo A, B,

b) preparar soluciones de anticuerpos anti-D monoclonales en un intervalo de concentraciones de 0 a 200 ng/ml en un tampón biológicamente aceptable,

30 c) poner en contacto dichos hematíes con muestras de soluciones de IgG e incubar las mezclas de hematíes así obtenidas durante un periodo predeterminado,

d) añadir a cada mezcla de hematíes un fragmento de anticuerpos anti-IgG humanos F(ab')₂ marcados por medio de un fluorocromo e incubar dichos hematíes,

e) someter cada mezcla de hematíes obtenida en la etapa d) a una citometría de flujo,

35 f) determinar el título de anticuerpos anti-A y/o anti-B en los concentrados de IgG por medio de la curva de calibración establecida para dosificar el anti-D, ventajosamente expresado en nanogramos/mililitro.

40 Un modo de realización de este método de determinación del título de anticuerpos anti-A y/o anti-B puede comprender la preparación de una suspensión de hematíes al 1% (v/v) del grupo sanguíneo A, B y/o O en un tampón PBS, de pH comprendido entre 7 y 7,4, que contiene de 0,8 a 1,5% en peso de albúmina de suero bovino BSA. Los hematíes de la suspensión son contados en un dispositivo de citometría de flujo habitual, cuya utilización es conocida por un experto en la técnica, de forma que se calibre la suspensión de 37 a 43.10⁶ hematíes/ml de suspensión. Se preparan soluciones de anticuerpos anti-D monoclonales cuyas concentraciones están comprendidas en el intervalo de 0 a 200 ng/ml de tampón, preferentemente un tampón PBS, de pH comprendido entre 7,0 y 7,4, que contiene en su caso de 0,8 a 1,5% en peso de albúmina de suero bovino BSA. Cada solución
45 así preparada es dosificada por absorciometría con el fin de determinar su coeficiente de extinción molar (ε).

Las composiciones de IgG son seguidamente ajustadas a una concentración comprendida en el intervalo de valores de 1 a 5 mg/ml, preferentemente a 1 mg/ml, por medio de un tampón PBS, de pH comprendido entre 7,0 y 7,4, que contiene de 0,8 a 1,5% en peso de albúmina de suero bovino BSA.

Se coloca un volumen de 50 a 100 µl de suspensión de hematíes de cada grupo sanguíneo en cada pocillo de una

microplaca, por ejemplo de 96 pocillos, seguidamente de 50 a 100 µl de soluciones de IgG en esta suspensión de hematíes, o 50 a 100 µl de soluciones de anticuerpos anti-D en esta suspensión de hematíes. El conjunto se deja incubar durante periodos comprendidos entre 1h30 y 2h30, en particular 2h, a temperatura habitualmente comprendidas entre 30 y 40°C, preferentemente 37°C.

- 5 Las diferentes mezclas de hematíes así obtenidas se lavan seguidamente de forma preferentemente con el tampón PBS que comprende la BSA anterior y se centrifugan, seguidamente se añaden a cada mezcla de hematíes, contenidas en un pocillo de microplacas, de 50 a 100 µl de anticuerpos F(ab')₂ de cabra anti-IgG marcadas con un fluorocromo como, por ejemplo, ficoeritrina, presentes en el tampón PBS y BSA anteriormente definidos.

La incubación del conjunto se realiza durante aproximadamente 20-30 minutos en ausencia de luz.

- 10 Las diferentes mezclas de hematíes así obtenidas se lavan seguidamente y se someten a una citometría de flujo realizada con cualquier aparato apropiado disponible en el comercio que comprenda un dispositivo de detección de fluorescencia de los compuestos analizados.

La intensidad media de fluorescencia (IMF) se expresa en función de la concentración de anticuerpos monoclonales anti-D y la ecuación de la recta de regresión se obtiene por medio del programa Excel.

- 15 Se deduce el contenido de anticuerpos anti-A y anti-B en los concentrados de IgG utilizados para la invención que es ventajosamente el proporcionado con anterioridad.

Preferentemente, un método de dosificación de estos AcaA y AcaB de los concentrados de IgG anteriores se efectúa mediante citometría de flujo adaptada al contexto de la invención, cuyo principio se basa en la utilización de hematíes humanos de grupo A o B, según la determinación específica del título de los AcaA y AcaB deseado, utilizando la detección de una señal de fluorescencia proporcional al contenido de estos anticuerpos.

- 20 Este método de dosificación comprende las etapas consistentes en:

Este método de dosificación comprende las etapas consistentes en:

a) preparar y calibrar una suspensión de hematíes del grupo sanguíneo A o B,

b) poner en contacto dichos hematíes con muestras diluidas de soluciones de IgG e incubar la mezcla así obtenida durante un periodo predeterminado,

- 25 c) incubar dichos hematíes en presencia de un anticuerpo anti-IgG marcado por medio de un fluorocromo, y

d) someter la suspensión de hematíes obtenida en la etapa c) a una citometría de flujo.

Se prepara una suspensión de hematíes al 1% (v/v) del grupo sanguíneo A o B en un tampón PBS de pH comprendido entre 7,0 y 7,4, que contiene de 0,8 a 1,5% en peso de albúmina de suero bovino BSA. Los hematíes de la suspensión se cuentan en un dispositivo de citometría de flujo habitual, cuya utilización es conocida por un experto en la técnica, de forma que se calibre la suspensión de 37 a 43.10 hematíes/ml de suspensión.

- 30 Se coloca un volumen de 50 a 100 µl de suspensión en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, seguidamente de 50 a 100 µl de diferentes soluciones de IgG diluidas de dos en dos a partir de una solución de 30 g/l hasta obtener una solución de IgG de 0,234 g/l.

Se coloca un volumen de 50 a 100 µl de suspensión en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, seguidamente de 50 a 100 µl de diferentes soluciones de IgG diluidas de dos en dos a partir de una solución de 30 g/l hasta obtener una solución de IgG de 0,234 g/l.

- 35 El conjunto se deja incubar durante periodos comprendidos entre 1h30 y 2h30, en particular 2h, a temperaturas habitualmente comprendidas entre 30 y 40°C, preferentemente 37°C.

Los hematíes se lavan seguidamente con tampón PBS que contiene BSA anterior y se centrifugan y seguidamente se añaden a cada pocillo de 50 a 100 µl de anticuerpos F(ab')₂ de cabra anti-IgG humanos marcados con un fluorocromo como, por ejemplo, ficoeritrina.

La incubación del conjunto (la etapa c)) se realiza durante aproximadamente 20-30 minutos en ausencia de luz.

- 40 La suspensión así obtenida se lava seguidamente y se somete a una citometría de flujo realizada con cualquier aparato apropiado disponible en el comercio que comprenda un dispositivo de detección de la fluorescencia de los compuestos analizados.

Como ejemplo, los contenidos de anticuerpos anti-A y B de tres concentrados de IgG denominados B1, B2 y B3, preparados respectivamente mediante fraccionamiento etanólico según el método de Cohn (B1), según la solicitud de patente WO 02/092632 (B2) y según la solicitud de patente WO 02/092632 seguido de una cromatografía de inmunoafinidad (B3) para el empobrecimiento en anticuerpos anti-A y anti-B, se presentan en la tabla 1 siguiente. Los resultados se presentan con relación al título testigo de anticuerpos anti-A y anti-B de la muestra B1 cuyo contenido en estos anticuerpos se fija arbitrariamente en 1, un título de referencia.

- 45 Como ejemplo, los contenidos de anticuerpos anti-A y B de tres concentrados de IgG denominados B1, B2 y B3, preparados respectivamente mediante fraccionamiento etanólico según el método de Cohn (B1), según la solicitud de patente WO 02/092632 (B2) y según la solicitud de patente WO 02/092632 seguido de una cromatografía de inmunoafinidad (B3) para el empobrecimiento en anticuerpos anti-A y anti-B, se presentan en la tabla 1 siguiente. Los resultados se presentan con relación al título testigo de anticuerpos anti-A y anti-B de la muestra B1 cuyo contenido en estos anticuerpos se fija arbitrariamente en 1, un título de referencia.

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

Tabla 1

Los resultados de esta tabla muestran en primer lugar que los contenidos de anticuerpos anti-A y anti-B de los concentrados de IgG (B1) preparados según el método de Cohn contienen aproximadamente cuatro veces menos que los concentrados de IgG (B2) preparados según el método descrito en el documento WO 02/092632. Además, el tratamiento posterior de estos concentrados de IgG mediante colonias de inmunofluorescencia reducen el título de anticuerpos anti-A en un factor de aproximadamente 5 y en un factor de aproximadamente 7 para anticuerpos anti-B (B3).

Otro método de determinación del contenido de anticuerpos anti-A y anti-B que puede ser ventajosamente utilizado consiste en la lisis mediante el complemento in vitro conocido por un experto en la técnica, pero que ha sido específicamente utilizado para las necesidades de la invención. Este método de dosificación comprende las etapas que consisten en:

- proceder a un radiomarcado de una suspensión de hematíes papainatados escogidos entre los grupos sanguíneos A, B, AB y 0, previamente contados, mediante un marcador radioactivo apropiado,
- poner en contacto los hematíes radiomarcados con muestras de concentrados de IgG en un volumen predeterminado,
- añadir un volumen igual al de la etapa b) de suero normal del grupo sanguíneo AB,
- incubar la mezcla obtenida en la etapa c) durante un periodo predeterminado, y
- medir la radioactividad de la solución incubada así obtenida.

Se prepara una suspensión de hematíes papainatados al 1% (v/v) del grupo sanguíneo A, B, AB o 0 que es seguidamente contada en una celda de Malassez para obtener 10^6 hematíes. Se añaden 100 μ Ci de ^{51}Cr (1 volumen para 1 volumen de hematíes). Se incuba el conjunto entre 1 y 2 horas y los hematíes radiomarcados se lavan seguidamente de 4 a 6 veces.

Los hematíes radiomarcados se ponen seguidamente en contacto con muestras de concentrados de IgG, a una concentración comprendida preferentemente entre 1 y 3 mg/ml, en particular 1,2 mg/ml para cuatro $4\text{-}6 \cdot 10^6$ hematíes radiomarcados, en un volumen, por ejemplo, de 100 μ l.

UN volumen igual al anterior, por ejemplo de 100 μ l, de suero normal del grupo sanguíneo AB es seguidamente añadido a la mezcla anterior para aportar los diferentes factores de la vía de complemento.

La mezcla de reacción así obtenida es seguidamente incubada, preferentemente durante periodos comprendidos entre 3 y 5 h, en particular 4 h, a temperaturas habitualmente comprendidas entre 30 y 40°C, preferentemente 37°C.

La mezcla de reacción es seguidamente centrifugada, preferentemente, y se procede a una medición de la radioactividad de la solución incubada según dispositivos apropiados disponibles en el comercio. La radioactividad medida de la solución es proporcional al nivel de hemólisis de los hematíes tratados y, consecuentemente, al contenido de anticuerpos anti-A y anti-B.

Como ejemplo, los niveles de hemólisis de los hematíes de los grupos sanguíneos, A, B y AB obtenidos considerando un concentrado de IgG de la invención (B3) y un concentrado de IgG de la técnica anterior (C1) que tienen los niveles de hemólisis más bajos entre los concentrados disponibles en el comercio, se indican en la tabla 2 siguiente.

Nivel de hemólisis de hematíes (%)	B3	C1 (Técnica anterior)
Grupo A	6	13
Grupo B	5	11
Grupo AB	6	13

Tabla 2

Otro objeto descrito es la utilización de una composición como se definió anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de la ictericia neonatal por incompatibilidad fetomaternal en el sistema ABO.

Todos los aspectos de la invención anteriormente mencionados están adaptados a esta utilización y forman parte de este otro objeto de la invención.

5 Otro objeto descrito es un método de tratamiento de la ictericia neonatal por incompatibilidad fetomaternal en el sistema ABO o de la enfermedad hemolítica neonatal ABO, que comprende la administración de una composición de IgG como se definió anteriormente.

En este modo de realización, la composición utilizada para la invención puede ser una solución para inyección, por ejemplo, una solución de inmunoglobulina humana normal para una inyección para utilización intravenosa a 5 g/100 ml (5%).

10 Ventajosamente, la solución para inyección puede ser dosificada a 1 g/100 ml (1%) o a 2 g/100 ml (2%), o a 3 g/100 ml (3%), o a 4 g/100 ml (4%) y, ventajosamente, hasta 5 g/100 ml (5%).

Ventajosamente, las dosis de IgG de la solución inyectable pueden estar comprendidas entre 1 g/100 ml y 5 g/100 ml o entre 2 g/100 ml y 5 g/100 ml o entre 3 g/100 ml y 5 g/100 ml.

15 La composición que permite realizar la invención puede ser administrada de forma simultánea o consecutiva a un tratamiento por fototerapia, por ejemplo, a una cantidad comprendida entre 500 mg/kg y 2.000 mg/kg. Esta administración puede ser repetida.

Todos los aspectos de la invención anteriormente descritos están adaptados este método de tratamiento.

Otras ventajas se podrán apreciar todavía por el experto en la técnica mediante la lectura de los ejemplos que siguen.

Ejemplos

20 Ejemplo 1: preparación de composiciones de IgG empobrecidas en anticuerpos anti-A y anti-B

Se obtiene una muestra de concentrado de IgG de 40 g/l (B2) mediante la realización del procedimiento descrito en el documento WO 02/092632.

25 Una columna cromatográfica de 50 cm de longitud y 42 mm de diámetro se rellena con una mezcla 50/50 (v/v) de soporte GLYCOSORB ABO injertado mediante trisacáridos correspondientes a los epitopos del grupo sanguíneo A y del grupo sanguíneo B y seguidamente es sometida a una etapa previa de lavado mediante 1.200 ml de agua.

Se inyecta concentrado de IgG B2 a razón de 0,2 l/ml de soporte por medio de una bomba. Una vez que este volumen ha sido percolado a través de la columna, ésta se lava mediante un volumen mínimo de agua para preparación inyectable (PPI) con el fin de recuperar las IgG presentes en el volumen muerto de la columna.

30 Se recupera un concentrado de IgG B3 de aproximadamente 40 g/l empobrecido en AcaA, AcaB y en IgG poli-reactivas que es sometido a una ultrafiltración de forma que el concentrado tenga 60 g/l y a una nano filtración de eliminación de virus sobre tres filtros dispuestos en serie y de umbrales de retención decrecientes de 100, 50 y 20 nm.

35 La disolución de los excipientes estabilizantes constituidos por una mezcla glicina de 7 g/l, manitol a 7 g/l y 20 ppm de Tween® 80 en el concentrado de IgG de 60 g/l está seguido de un ajuste de la concentración de IgG a 50 g/l por medio de agua PPI y seguidamente el concentrado se filtra en condiciones estériles y se reparte en frascos.

Ejemplo 2: cuantificación de los anti-A/B en las IGIV

1) Principio de la dosificación

1.1) Preparación de los hematíes humanos

40 Las suspensiones de hematíes humanos del grupo A Rhesus +, B Rhesus + o 0 Rhesus + se normalizan a la concentración de 40×10^9 hematíes/ml en tampón PBS + 1% BSA a pH = 7,4.

1.2) Preparación de la gama de anti-D monoclonal

45 Una preparación de anti-D monoclonal (denominados R297) es dosificada para densidad óptica (DO) a 280 nm frente a tampón de PBS, de pH 7,4. El coeficiente de extinción molar (ϵ) de la proteína se calcula con respecto a su composición en diferentes aminoácidos y la concentración (C) de anti-D monoclonal se obtiene aplicando la fórmula $C = DO / \epsilon$ con $l =$ anchura del vaso para efectuar la medición de la DO.

Se realiza una gama de 0 a 200 ng/ml de anticuerpos monoclonales anti-D en 12 puntos (200; 150; 100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 y 0 ng/ml).

1.3) Preparación de las soluciones de inmunoglobulinas

Se estudiaron diferentes inmunoglobulinas intravenosas, disponibles en el comercio. Las características principales de estas inmunoglobulinas se detallan en la tabla siguiente:

Denominación	Proveedor	Concentración
Inmunoglobulina polivalente	A	50 g/l
Inmunoglobulina polivalente	B	50 g/l
Inmunoglobulina humana intravenosa al 10%	C	100 g/l
IgNG 2 (*)	LFB	50 g/l
IgNG 1 (**)	LFB	50 g/l
TEGELINE \square	LFB	50 g/l

5 * realizadas por medio de la práctica del procedimiento descrito en el documento WO 02/092632 seguido de la etapa de inmunoafinidad descrita en el ejemplo 1

** realizada por medio de la práctica del procedimiento descrito en el documento WO 02/092632, sin etapa de inmunoafinidad como se describe en el ejemplo 1.

10 Las diferentes preparaciones de inmunoglobulinas son añadidas a la concentración de 1 mg/ml por medio de un tampón PBS + 1% BSA a pH = 7,4.

1.4) Sensibilización de los hematíes

En una microplaca de fondo redondo se depositan en los pocillos:

- 50 μ l de la suspensión de hematíes A Rhesus +, B Rhesus + o 0 Rhesus + a 40×10^6 hematíes/ml,

15 - 50 μ l de la gama anti-D o 50 μ l de las muestras (IgIV) que van a ser dosificadas. Las muestras que van a ser dosificadas se depositan por triplicado.

Las placas se incuban seguidamente 2 horas a 37°C bajo agitación.

1.5) Lavados

Las placas se centrifugan 1 minutos a 770 g. La materia sobrenadante se separa por centrifugación y seguidamente se añaden 200 μ l de PBS + 1% de BSA a cada pocillo. La operación se repite 3 veces.

20 1.6) Adición de conjugado y lavados

Un F(ab'2) de cabra anti-IgG humano (específico de Fc) marcado con polieritrina (PE) (Beckman Coulter Ref: PN IM0550) se diluye 1/20 veces en tampón PBS + 1% de BSA, pH = 7,4, seguidamente se depositan 50 μ l de la solución en cada pocillo. La placa se incuba seguidamente de 20 a 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Se realizan 3 lavados sucesivos como se describió en el apartado 1.5).

25 1.7) Lectura en citómetro de flujo

Las suspensiones de hematíes se leen en el citómetro de flujo (Beckman Coulter FC500) según un programa apropiado.

La lectura se efectúa sobre 50.000 acontecimientos y el aparato calcula automáticamente la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada punto de gama o muestra.

30 1.8) Interpretación de los resultados

La IMF se expresa en función de la concentración de anticuerpo monoclonal anti-D y la ecuación de la recta de regresión se obtiene por medio del programa Excel. Seguidamente se obtiene para cada muestra la concentración en equivalente de anticuerpo anti-D utilizando la ecuación lineal de la recta de regresión. Tras dosificar las muestras por triplicado, se establece la media de la concentración y se calcula el coeficiente de variación mediante el programa Excel.

35

2) Resultados:

2.1) Concentración de anticuerpo anti-A

Nombre	Hematías 0 Rhesus +	Hematías A Rhesus + (ng de Ig anti-A/mg de Ig)	CV%
Inmunoglobina polivalente, A	ns	55,4	4,5
Inmunoglobulina polivalente, B	ns	44,5	3,5
Inmunoglobulina humana intravenosa al 10%, C	ns	117,9	14,6
IgNG 2	ns	22,2	5,5
IgNG 1	ns	119,8	4,9
TEGELINE	ns	35,6	5,0

ns = no significativo

2.2) Concentración de anticuerpo anti-B

Nombre	Hematías 0 Rhesus +	Hematías B Rhesus + (ng de Ig anti-B/mg de Ig)	CV%
Inmunoglobina polivalente, A	ns	64,0	0,9
Inmunoglobulina polivalente, B	ns	42,4	5,1
Inmunoglobulina humana intravenosa al 10%, C	ns	89,0	20,5
IgNG 2	ns	16	9,9
IgNG 1	ns	155,2	4,8
TEGELINE	ns	44,2	8,0

ns = no significativo

3) Conclusiones:

- 5 La etapa de afinidad contribuye realmente a la eliminación de los anticuerpos anti-A y anti-B. Entre las diferentes inmunoglobulinas estudiadas presentes en el mercado, el producto IgNG 2 es el producto que contiene menos anticuerpos anti-A y anticuerpos anti-B.

Ejemplo 3: Cuantificación de los anti-A y anti-B del concentrado de IgG B obtenido en el ejemplo 1

- 10 Se prepara una suspensión de hematías al 1% (v/v) del grupo sanguíneo A en un tampón de PBS, de pH 7,4, que contiene 1% en peso de albúmina de suero bovino BSA. Se recogen 50 µl de la suspensión de hematías y se introducen en un tubo para un citómetro de flujo (Beckmann-Coulter Epics XL, así como 50 µl de una solución de marcador interno que mide el flujo. La suspensión se calibra a $40 \cdot 10^6$ hematías/ml.

- 15 Se preparan ocho lotes de soluciones de IgG por dilución sucesiva en un factor 2 del concentrado de IgG (v/v) (B3) obtenido en el ejemplo 1, siendo el lote más concentrado de 30 g/l y el más diluido de 0,234 g/l. Se coloca seguidamente un volumen de 50 µl de la suspensión en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos y seguidamente 50 µl de las diferentes soluciones de IgG diluidas. El conjunto se deja incubar durante 2h a una temperatura de 37°C, bajo agitación.

- 20 Cada pocillo se lava seguidamente con 200 µl de tampón PBS que contiene BSA anterior y la microplaca se centrifuga durante 1 minutos a 2.000 revoluciones/minuto. Después de la eliminación de la materia sobrenadante, se añaden a cada pocillo 50 µl de una solución diluida en 1/20 mediante PBS-BSA de anticuerpo F(ab')₂ de cabra anti-IgG humano marcado con fluorocromo de ficoeritrina (Beckmann Coulter).

La incubación del conjunto se realiza durante 30 minutos en ausencia de luz.

La suspensión así obtenida se lava seguidamente como anteriormente.

Se recoge el depósito de pocillo mediante 100 µl de PBS-BSA. El volumen contenido en cada pocillo de la microplaca se transfiere a un tubo al que se añaden seguidamente 500 µl de líquido de un conducto Isoflow (Coulter) y se somete a una citometría de flujo realizada con el dispositivo Coulter-Beckmann Epics XL que comprende programas de adquisición de datos y explotación de los resultados. Se mide la fluorometría para cada muestra.

5 Se procede de la misma forma con hematíes grupo sanguíneo B.

Este modo de actuación se realiza con tres lotes diferentes de IgG (B3) y se aplica igualmente a tres lotes diferentes de IgG preparados mediante fraccionamiento etanólico según el método de Cohn (citado con anterioridad) (B1).

Los resultados obtenidos figuran en la tabla 3 siguiente.

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

Tabla 3

10

Ejemplo 4: Medición de la hemólisis de los hematíes

Se prepara una suspensión de hematíes papainatados al 1% (v/v) del grupo sanguíneo A, B, AB o 0 que seguidamente se cuenta celda Malassez para obtener 10 hematíes. Se añaden 100 µCi de ⁵¹Cr (1 volumen para 1 volumen de hematíes). Se incuba el conjunto durante 1 hora y los hematíes radiomarcados se lavan seguidamente 5 veces.

15

Los hematíes radiomarcados se ponen seguidamente en contacto de muestras de concentrados de IgG (B2) obtenidos en el ejemplo 1, a una concentración de 1,2 mg/ml para 5 · 10⁶ hematíes radiomarcados en un volumen de 100 µl.

20

Se añade seguidamente un volumen igual al precedente de 100 µl de suero normal del grupo sanguíneo AB a la mezcla anterior para aportar los diferentes factores del complemento.

La mezcla de reacción así obtenida se incuba seguidamente, 4h, a una temperatura de 37°C.

25

La mezcla de reacción se centrifuga seguidamente durante 1 minuto a 2.000 revoluciones/minuto y se procede a una medición de la radioactividad de la solución sobrenadante incubada, según dispositivos apropiados disponibles en el comercio. La radioactividad medida de la solución es proporcional a los niveles de hemólisis de los hematíes tratados y, como consecuencia, al contenido de anticuerpos anti-A y anti-B. Se procede de forma igual con hematíes sanguíneos B, AB y 0, siendo todos de Rhesus +, y con una muestra de suero del grupo 0+. Este modo de actuación se lleva a cabo con tres lotes diferentes de IgG (B2). Además, se aplica el procedimiento a tres lotes de muestras comerciales de concentrados de IgG, indicadas C2 a C4 y una muestra C5 de suero del grupo 0+ incluida como testigo negativo.

30

La radioactividad medida de la solución es proporcional al nivel de hemólisis de los hematíes tratados y, como consecuencia, a la cantidad de anticuerpos anti-A y anti-B fijados sobre los hematíes.

Los resultados de hemolisis obtenidos se presentan en la tabla 4 siguiente.

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

Tabla 4

5 Los resultados obtenidos muestran que el concentrado de IgG B3 que fue sometido a una cromatografía de afinidad según la invención contiene la cantidad más baja de AcaA y AcaB, dado que el nivel de hemolisis de los hematíes procedente de los diferentes grupos sanguíneos es el más bajo. No se observa hemolisis con hematíes de fenotipo 0+ incluido como testigo negativo.

Ejemplo 5: Medición de la poli-reactividad de concentrados de IgG B2 (antes de la cromatografía de inmutofinidad) y después de esta cromatografía (concentrado de IgG B3) descritas en el ejemplo 1

10 La medición de la poli-reactividad de estos concentrados de IgG se efectúa según la patente EP 1.059.088 utilizando dos antígenos que reaccionan con las IgG poli-reactivas. Se trata de miosina y albúmina modificada por grupos dinitrofenilo (albúmina DNP).

La tabla 5 presenta los factores de enriquecimiento de las IgG poli-reactivas de las muestras B2, B3 y C4 del ejemplo 3, cuyo contenido de IgG fue fijado arbitrariamente a 1, como referencia.

Estas mediciones se efectuaron sobre tres lotes diferentes de concentrados de IgG considerados.

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

Tabla 5

15 Los resultados indican que la concentración de IgG B3 de la invención contiene de 5 a 8 veces menos IgG poli-reactivas que el concentrado de la técnica anterior C4.

Ejemplo 6: Ejemplo comparativo sobre eficacia de los concentrados de IgG (B3) empobrecidos en AcaA, AcaB y de IgG poli-reactivas, con concentrados de IgG (B1)

20 El estudio se llevó a cabo en ratones deficientes en receptores FcRI y FcRIII tratados con vistas a la evaluación de la actividad inmunomoduladora de los concentrados de IgG según la invención. Estos animales sirven para un púrpura trombocitopénico. Se utiliza como testigo un concentrado de IgG (B1) obtenido mediante fraccionamiento etanólico según Cohn.

25 Se aplica el protocolo experimental descrito por Teeling J. L et al (Blood, 15/08/2001, vol. 98, number 4, pp.1095-1099 [10]). Las plaquetas, descompuestas mediante inyección de IgG monoclonales antiplaquetas a $9 \cdot 10^8$ /ml a un nivel de $2 \cdot 10^8$ /ml se elevan hasta $7 \cdot 10^8$ /ml, en los animales tratados mediante los concentrados de IgG B1 y B3 a una dosis terapéutica de 1 g/kg.

La actividad inmunomoduladora del concentrado de IgG B3 según la invención no fue modificada mediante la realización una cromatografía de inmutofinidad.

Ejemplo 7: Ejemplo de realización

Evaluación de la dosis que va a ser administrada y de la tolerancia al tratamiento

5 La composición de IgG que permite realizar la invención, por ejemplo, la composición B3 u otra composición de IgG disponible en el mercado, es administrada a recién nacidos, niños y niñas, con un tiempo de 28 días, afectados por la enfermedad hemolítica ABO, cuyos síntomas son hiperbilirrubinemia, un ensayo de antiglobulinas neonatales directas positivo (ensayo de Coombs directo) y un recuento de reticulocitos elevado (superior o igual a 10%).

10 Los criterios de exclusión de los pacientes son una deficiencia de IgA, presencia de anticuerpos anti-IgE/IgG, indicación de una transfusión de intercambio en el nacimiento con un nivel de bilirrubina en el cordón umbilical superior o igual a 4 mg, una anasarca feto-placentaria (hydrops fetalis), una insuficiencia cardíaca y un tratamiento prenatal (IVIG maternal y/o transfusión in utero).

El protocolo de tratamiento es una administración de IgG a 500 mg/kg y 2.000 mg/kg (n= aproximadamente 10), solo o en combinaciones con una fototerapia, susceptible de ser repetido.

Los criterios de evaluación primarios son la necesidad de una transfusión de intercambio y el nivel de bilirrubina total de suero se mide 3 días después de la primera administración de la composición.

15 Los principales criterios de evaluación secundarios son la duración total de la fototerapia, la duración del tiempo de hospitalización, el desarrollo de una anemia tardía en 27º de post-parto, el nivel de bilirrubina total en suero 24 horas después de la primera administración de la composición de inmunoglobulinas.

El análisis comparativo de los resultados se realiza por medio del método de Kaplan Meier.

20 La regla de detención es el inicio de una transfusión de intercambio de acuerdo con las directivas de las prácticas clínicas de la entidad American Academy of Pediatrics Subcommittee on Hyperbilirubinemia (Pediatrics. 2004 Jul; 114(1): 297-316).

Se miden los niveles de bilirrubina, mediante numerosos ensayos conocidos, de forma que se siga la evolución de la remisión del paciente.

Lista de referencias

25 [1] Cohn et al. 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459; Oncley et al. 1949, J. Am. Chem. Soc. 71, 541.
 [2] Gottstein et al. (2003), Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition, vol. 88, no. 1, p. F6-F10.
 [3] Alplay et al. (1999), Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics; vol. 88, no. 2, p. 216-219.
 [4] Nasser et al. (2006) Saudi Med J.; 27(12): 1827-30.
 [5] Steinbuch et al. (1969) Rev. Franc. Et. Clin, et Biol., XIV, 1054.

30 [6] Buchta C. et al, Biologicals, 33, 2005, 41- 48.
 [7] Wilson J. R. et al, Muscle & Nerve, 29(9), 1997, 1142- 1145.
 [8] Copelan E.A et al, Transfusion, 26, 1986, 410-412.
 [9] Misbah S.A et al, Drug Safety, 9, 1993, 254-262.
 [10] Teeling J. Letal (Blood, 15/08/2001, vol. 98, number 4, pp.1095-1099.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de inmunoglobulinas G (IgG) de uso terapéutico, que comprende títulos respectivos de anticuerpos anti-A y anti-B conformes a un resultado negativo del ensayo de Coombs indirecto (método 2.6.20 de la Farmacopea Europea), para su utilización en el tratamiento de ictericia neonatal por incompatibilidad fetomaternal en el sistema ABO o de la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad ABO.
2. Composición para la utilización según la reivindicación 1, de dichos títulos respectivos de anticuerpos anti-A y anti-B conformes a un resultado negativo del ensayo de Coombs indirecto que es de un valor inverso de 64 de la dilución.
- 10 3. Composición para la utilización según la reivindicación 1, estando comprendidos dichos títulos respectivos de anticuerpos anti-A y anti-B conformes a un resultado negativo del ensayo de Coombs indirecto que están comprendidos entre 0 y 8 del valor inverso de la dilución.
4. Composición para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo realizado dicho ensayo de Coombs indirecto con una solución de IgG de concentración inicial llevada a 30 g/l.
- 15 5. Composición para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que presenta un contenido de IgG poli-reactivas residuales comprendido entre 0,01% y 0,1% con respecto al contenido total de IgG.
6. Composición para la utilización según una de las reivindicaciones anteriores, que comprende además estabilizantes.
- 20 7. Composición para la utilización según una de las reivindicaciones anteriores, en la que los estabilizantes representan una mezcla de un azúcar alcohólico, preferentemente manitol o sorbitol, glicina y un detergente no iónico.
8. Composición para la utilización según una de las reivindicaciones anteriores, inyectable por vía intravenosa.
9. Composición para la utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, obtenida mediante un procedimiento que comprende las etapas siguientes:
 - 25 a) preparación de un concentrado de IgG por fraccionamiento etanólico y/o por separación cromatográfica, que comprende una etapa de inactivación viral,
 - b) cromatografía de inmutafinidad por percolación de la composición de IgG sobre una mezcla de soportes cuyas matrices están injertadas con grupos de oligosacáridos antigénicamente similares a los grupos sanguíneos A y B, y
 - c) filtración de eliminación de virus y/o partículas de tamaño superior a 20 nm.
- 30 10. Composición para la utilización según la reivindicación 9, comprendiendo la etapa a) de dicho procedimiento una purificación previa mediante precipitación de contaminantes lípidos a partir de un plasma sanguíneo o de una fracción de plasma sanguíneo enriquecido en IgG, una cromatografía única sobre un soporte de resina de intercambio de aniones efectuada a pH alcalino y una elución selectiva de las IgG en una etapa mediante un tampón apropiado a un pH comprendido entre 4 y 7.
- 35 11. Composición para la utilización según la reivindicación 9 ó 10, en que los grupos de oligosacáridos de dicho procedimiento representan trisacáridos correspondientes a los epítopos de los grupos sanguíneos A y B.
12. Composición para la utilización según una de las reivindicaciones 8 a 11, siendo efectuada la etapa de inactivación viral de dicho procedimiento mediante disolvente-detergente.
- 40 13. Composición para la utilización según una de las reivindicaciones 8 a 12, en que dicha mezcla de soportes injertados de los grupos antigénicamente similares al grupo sanguíneo A y al grupo sanguíneo B están en una proporción respectiva comprendida entre 25/75 y 75/25 (v/v), preferentemente 50/50 (v/v) en cada uno de dichos soportes.
14. Composición para la utilización según una de las reivindicaciones 8 a 13, comprendiendo dicho procedimiento etapas de concentración por ultrafiltración y filtración esterilizante.
- 45 15. Composición para la utilización según la reivindicación 14, siendo efectuada dicha etapa de filtración esterilizante por nanofiltración.
16. Composición para la utilización según una de las reivindicaciones 9 a 15, comprendiendo dicho procedimiento, después de la etapa c), una etapa de adición de estabilizantes de conservación a dicho concentrado de IgG.