

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 983**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2011** **E 11723563 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015** **EP 2567238**

54 Título: **Procedimiento de medición de la activación del complemento mediante IgG**

30 Prioridad:

05.05.2010 FR 1053515

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2015

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
Zone d'Activité de Courtaboeuf, 3, avenue des
Tropiques
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**DHAINAUT, FRÉDÉRIC y
PERRET, GÉRALD**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 546 983 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de medición de la activación del complemento mediante IgG

5 **Sector de la técnica**

La invención se refiere a un procedimiento de medición de la activación del complemento mediante inmunoglobulinas G (IgG), en particular inmunoglobulinas G intravenosas humanas (IVIG). El procedimiento permite seleccionar las IVIG en función de su efecto sobre el complemento.

10

Estado de la técnica

Las IVIG son un concentrado de inmunoglobulinas G no agregadas preparadas a partir de una mezcla de plasma humano. Su función está intacta, y su pureza es la más alta posible (> 99,9 %).

15

Las IVIG modulan, mediante unos mecanismos moleculares selectivos y a menudo distintos, ciertos procesos biológicos implicados en la respuesta inmune innata o adquirida. Estos últimos incluyen:

20

- un bloqueo funcional de los receptores Fc del sistema reticulo-endotelial. Esto permite en particular tratar las citopenias auto-inmunes periféricas, como la púrpura trombocitopénica idiopática;
- la neutralización de auto-anticuerpos y la inhibición de su producción. Las IVIG contienen en efecto anticuerpos anti-idiotípicos. Dicha actividad neutralizante o inhibidora se ha demostrado por ejemplo para los auto-anticuerpos contra el factor VIII, el ADN, el factor intrínseco, la tiroglobulina y los ANCA (Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies);
- 25 - la modulación de la producción de citocinas (entre las que están la IL-1, -2, -3, -4, -5, -10, la TNF- α y el GM-CSF) y de sus antagonistas (como la IL-1 RA), de lo que resulta una actividad anti-inflamatoria;
- la activación del complemento;
- o incluso la activación o el bloqueo funcional del receptor de muerte celular Fas (CD95).

30

Hoy en día, la administración de IVIG se ha convertido en un gesto terapéutico que conlleva muy pocos riesgos o efectos secundarios (< 1 %). Estos últimos son leves gracias a la mejora constante de la calidad de estos productos.

35

La mayor parte de los efectos secundarios de carácter leve y transitorio se producen en la primera hora de perfusión; comprenden mialgias, cefaleas, sofocos, sensación de opresión, dorsalgias, náuseas, vómitos, broncoespasmos, o incluso alteraciones del pulso y/o de la tensión arterial. Son probablemente la consecuencia de una cierta agregación de las inmunoglobulinas, de la formación de complejos antígeno-anticuerpo y la activación del complemento, o de azúcares presentes en las IVIG con el objetivo de prevenir su agregación. Estos efectos secundarios se controlan por lo general reduciendo la velocidad de perfusión o administrando rápidamente esteroides o antihistamínicos e incluso simpaticomiméticos.

40

Sin embargo, en determinados casos puede producirse una insuficiencia renal aguda y/o una anemia hemolítica. En casos extremos, puede producirse una reacción anafiláctica, y esto en particular en pacientes que tienen una deficiencia de IgA séricas.

45

Por lo tanto, la disminución de los efectos secundarios de las IVIG, aunque estos sean leves, sigue siendo la preocupación principal en el desarrollo de estas moléculas.

50

Diferentes métodos están actualmente disponibles para evaluar estos efectos secundarios, por ejemplo la prueba de AAC (actividad anticomplementaria) de la farmacopea europea, también llamado ensayo de actividad anticomplementaria de la inmunoglobulina; o incluso la prueba de Coombs. La prueba de AAC es compleja y hace que intervengan reactivos difíciles de normalizar. En efecto, la determinación de la actividad anticomplementaria (AAC) de la inmunoglobulina se realiza mediante incubación de una cantidad dada de la inmunoglobulina que hay que examinar con una cantidad dada de complemento de cobaya seguida de la valoración del complemento restante. El complemento restante se mide mediante la lisis de eritrocitos de oveja sensibilizados con anticuerpos de conejo.

55

En cuanto a la prueba de Coombs, permite verificar la ausencia de inmunoglobulina que se pueda fijar en los hematíes y que pueda provocar la aglutinación y la lisis de los hematíes.

60

SPYCHER M. y otros: "In vitro comparison of the complement-scavenging capacity of different intravenous immunoglobulin preparations", VOX SANGUINIS, vol. 97, n.º. 4, 2009, págs. 348-354, describe la comparación de las propiedades de captura del complemento por diferentes IVIG. Esta comparación se realiza de acuerdo con varios protocolos, concerniendo a la captura de C3b/iC3b por las IVIG, al enlace del C3b activado con las IVIG y a la generación de C5a por las IVIG.

65

Existe, por lo tanto, la necesidad de disponer de pruebas lo suficientemente sensibles para seleccionar diferentes

calidades de IVIG, que sean fáciles de implementar para una utilización rutinaria. También existe la necesidad de disponer de pruebas pertinentes y predictivas para el ser humano. Estas pruebas deben, en particular, demostrar una buena calidad y una seguridad suficiente de las IVIG para el paciente.

Es la razón por la que la solicitante se ha centrado en el desarrollo de un nuevo procedimiento *in vitro* que permita evaluar la acción de las IgG, en particular de las IVIG, sobre la activación del complemento. Este procedimiento permite seleccionar fácilmente las IgG que tienen el menor número de efectos secundarios posible, y esto con una sensibilidad suficiente para discriminar diferentes calidades de IgG. Este procedimiento utiliza suero humano y es, por consiguiente, predictivo del resultado en el ser humano.

Objeto de la invención

La presente invención tiene, por lo tanto, por objeto un procedimiento de medición de la activación del complemento mediante unas inmunoglobulinas G, que comprende las siguientes etapas:

- a) preparación de una muestra A de inmunoglobulinas G (IgG), y de una muestra B que comprende suero nativo, diluyéndose dicho suero nativo eventualmente en una disolución tampón;
- b) mezcla de la muestra A con la muestra B en una proporción (cantidad de IgG en A, en gramos) : (volumen de suero nativo en B, en litros) comprendida entre 30 y 75, a una temperatura comprendida entre 2 °C y 6 °C, y a continuación incubación de la mezcla reactiva obtenida a una temperatura comprendida entre 35 °C y 40 °C durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 2 horas;
- c) enfriamiento de la mezcla reactiva obtenida al final de la etapa b) a una temperatura comprendida entre 0 °C y 4 °C, y en presencia de EDTA;
- d) medición de la cantidad de fragmento C5a en la mezcla reactiva enfriada obtenida en c).

Por supuesto, el procedimiento de acuerdo con la invención es un procedimiento *in vitro*.

Este procedimiento mide la activación del complemento mediante unas IgG, de preferencia unas IgG humanas, de preferencia unas IVIG. También de preferencia, la muestra A es una muestra de IVIG.

La etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención comprende la preparación de una muestra A de IgG. Esta muestra A se puede obtener en particular a partir de IVIG comerciales, como Privigen de CSL Behring AG, Gamunex de Bayer Corporation, Intratect de Biotest Pharma GmbH, Kiovig de Baxter AG o Octagam d'Octapharma. La preparación puede estar en forma líquida o liofilizada, como Sandoglobulin de CSL Behring AG.

La muestra A también se puede obtener a partir de IVIG no comerciales, como nuevas IVIG (IgNG).

Las IgG, de preferencia IVIG, se pueden diluir en un medio tampón utilizado tradicionalmente, como el tampón fosfato salino/suero de albúmina bovina (p. ej. PBS-BSA). De preferencia, las IgG, en particular las IVIG, se diluyen en un tampón que comprende BSA.

La etapa a) también comprende la preparación de una muestra B que comprende suero nativo.

Por suero, se entiende el plasma sanguíneo sin fibrina. Por "suero nativo" se entiende un suero no diluido. El suero nativo es, de preferencia, suero humano nativo. El suero nativo de la muestra B puede proceder de diferentes donantes, con diferentes grupos sanguíneos. De preferencia, el suero nativo es un suero humano de grupo sanguíneo AB+.

De preferencia, el suero nativo se conserva congelado hasta su utilización, por ejemplo a una temperatura de -80 °C. Durante la utilización, se va descongelando lentamente hasta la temperatura de mezcla.

La muestra B puede contener únicamente suero nativo; como alternativa, la muestra B comprende suero nativo diluido en una solución tampón.

Dicha solución tampón es clásica y se puede seleccionar entre el tampón fosfato salino (PBS) y el PBS-BSA.

De preferencia, la solución tampón comprende BSA; de preferencia la solución tampón es el PBS-BSA.

De preferencia, la muestra A comprende unas IgG diluidas en un tampón idéntico a la solución tampón de la muestra B.

Una vez preparadas las muestras A y B, estas últimas se mezclan y a continuación se incuban en unas condiciones específicas durante la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención.

En efecto, la mezcla de las muestras A y B se hace:

- en una proporción (cantidad de IgG en A, en gramos) : (volumen de suero nativo en B, en litros) comprendida entre 30 y 75; y
- a una temperatura comprendida entre 2 °C y 6 °C.

5 La proporción (cantidad de IgG en A, en gramos) : (volumen de suero nativo en B, en litros) define la cantidad de IgG que actúa sobre un volumen de suero nativo. La cantidad de IgG presente en A se determina en gramos, y el volumen de suero nativo presente en B se determina en litros.

10 Por ejemplo, si la muestra A corresponde a 20 µl de una solución de IgG con 100 g/l, entonces la cantidad de IgG presente en A es de $100 \times 20 \times 10^{-6} = 2 \cdot 10^{-3}$ g. Del mismo modo, si la muestra B corresponde a 80 µl de una solución de suero nativo diluido al 25 % en una solución tampón, entonces el volumen de suero nativo en B es de $80 \times 10^{-6} \times 0,25 = 2 \times 10^{-5}$ l (esto es 20 µl). En este caso, la proporción (cantidad de IgG en A, en gramos) : (volumen de suero nativo en B, en litros) es de 2/0,02, esto es 100.

15 De preferencia, la proporción (cantidad de IgG en A, en gramos) : (volumen de suero nativo en B, en litros) está comprendida entre 35 y 70, de preferencia entre 40 y 65, de preferencia entre 45 y 60, de preferencia entre 45 y 55, de preferencia es de aproximadamente 50.

20 La temperatura de mezcla está comprendida entre 2 °C y 6 °C, de preferencia entre 3 °C y 5 °C, de preferencia es de aproximadamente 4 °C. De este modo, la mezcla puede hacerse en un recipiente, por ejemplo un tubo de ensayo, conservado en el hielo hasta su incubación.

25 Si deben probarse varias muestras A y B, todas las mezclas reactivas se realizan a una temperatura comprendida entre 2 °C y 6 °C, de preferencia a 4 °C, y a continuación se realiza simultáneamente la incubación de forma uniforme.

30 Una vez obtenida la mezcla de las muestras A y B (de aquí en adelante mezcla reactiva), la mezcla reactiva se incuba a una temperatura comprendida entre 35 °C y 40 °C durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 2 horas. De preferencia, la mezcla reactiva se incuba a una temperatura de aproximadamente 37 °C, durante un tiempo comprendido entre 45 minutos y 1 h 30, de preferencia comprendido entre 45 minutos y 1 hora, de preferencia aproximadamente 1 hora.

35 La incubación se hace con unos aparatos estándar, por ejemplo en el horno o en un baño maría controlado por termostato.

40 La mezcla reactiva se enfría a continuación durante una etapa c), con el fin de detener las reacciones biológicas que se desarrollan durante la incubación. Este enfriamiento de la mezcla reactiva obtenida al final de la etapa b) se hace a una temperatura comprendida entre 0 °C y 4 °C en presencia de EDTA. De este modo, la etapa c) puede desarrollarse poniendo los tubos de ensayo que comprenden las mezclas reactivas incubadas en hielo, y añadiendo EDTA en cantidad suficiente. De preferencia, el EDTA se utiliza en una concentración comprendida entre 50 mM y 200 mM, de preferencia de aproximadamente 100 mM.

45 En la mezcla reactiva obtenida al final de la etapa c), se mide (etapa d) entonces la cantidad de fragmento C5a del complemento.

La etapa d) se puede hacer mediante cualquier método de medición utilizado tradicionalmente, y en particular por medio de kits comerciales. Por ejemplo, se puede hacer mediante ELISA, utilizando unos kits comerciales de detección de la proteína C5a, como los que vende Quidel o R&D system o Abcam.

50 La cantidad de fragmento C5a liberada a lo largo del procedimiento de acuerdo con la invención es determinante para evaluar los eventuales efectos secundarios de las IgG probadas. Cuanto más importante es esta cantidad, más efectos indeseables tendrán las IgG.

55 Con el fin de evaluar la calidad de las IgG de la forma más precisa y sensible posible, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende de manera ventajosa una etapa adicional e) de comparación de la cantidad obtenida en d) (p. ej. cantidad de fragmento C5a liberada por medio de la muestra A y, por lo tanto, por medio de las IgG probadas) con la cantidad obtenida al sustituir la muestra A por un control positivo.

60 Por control positivo se entiende una muestra responsable de una activación máxima del complemento y, por lo tanto, de una liberación máxima de fragmento C5a. De este modo este control positivo sirve de referencia, ya que corresponde al 100 % de activación del complemento.

65 El control positivo se selecciona de manera entre las muestras de lipopolisacáridos (LPS) y, en particular, entre los LPS de *Escherichia Coli* (*E. Coli*) de serotipo 0127:B8 purificados mediante cromatografía intercambiadora de iones, los LPS de *E. Coli* de serotipo K-235, los LPS de *Salmonella enterica* de serotipo *typhimurium*, los LPS de *Klebsiella pneumoniae*, los LPS de *E. Coli* de serotipo 0127:B8 extraídos con ácido tricloroacético, los LPS de mutantes de

Shigella flexneri, y los LPS de *E. Coli* de serotipo 0127:B8 purificados mediante extracción con fenol.

De preferencia, el control positivo está compuesto por los LPS de *E. Coli* de serotipo 0127:B8 purificados mediante extracción con fenol. Estos LPS activan, en efecto, enormemente la liberación de fragmento C5a, y lo hacen de forma reproducible.

De preferencia, el procedimiento de acuerdo con la invención también comprende una etapa adicional f) de comparación de la cantidad obtenida en d) (p. ej. cantidad de fragmento C5a liberada por medio de la muestra A y, por lo tanto, por medio de las IgG probadas) con la cantidad obtenida al sustituir la muestra A por un control negativo. Por control negativo se entiende una muestra responsable de la liberación de una cantidad basal de fragmento C5a. Este control negativo corresponde, en particular, a una muestra que comprende únicamente la disolución tampón de la muestra B, por ejemplo el tampón PBS o el tampón PBS-BSA.

Esta etapa f) se puede realizar al mismo tiempo, con anterioridad o con posterioridad a la etapa e).

De preferencia, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende, como la etapa e) anterior, una etapa de medición del porcentaje de activación del complemento, obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{prueba} - \text{control negativo}] / [\text{activación máxima del complemento} - \text{control negativo}] * 100$$

en la que:

“prueba” es la cantidad de fragmento C5a medida en la mezcla reactiva probada;

“control negativo” es la cantidad de fragmento C5a medida en la mezcla reactiva en la que se ha sustituido la muestra A por la disolución tampón;

“activación máxima del complemento” es la cantidad de fragmento C5a medida en la mezcla reactiva en la que se sustituye la muestra A por unos LPS de *E. Coli* de serotipo 0127:B8 purificados mediante la extracción con fenol.

De preferencia, cuando se utiliza un control positivo compuesto por unos LPS, en particular los LPS de *E. Coli* de serotipo 0127:B8 purificados mediante la extracción con fenol, la proporción (cantidad de LPS, en gramos) : (volumen de suero nativo en B, en litros) está comprendida entre 6 y 15, de preferencia entre 7 y 14, de preferencia entre 8 y 13, de preferencia la proporción es de aproximadamente 10.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin por ello limitar su alcance.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1: procedimiento de medición de la activación del complemento mediante unas IgG

Material:

Suero humano nativo: obtenido mezclando el suero nativo de 4 donantes de tipo AB, y conservado a -80 °C. El suero se descongela cuidadosamente a 4 °C antes de su utilización. Para la prueba ELISA, los anticuerpos monoclonales anti-C5a humano (para el recubrimiento) y los anticuerpos policlonales anti-C5a humano biotinilados (para el revelado) proceden de R&D system.

Prueba de liberación de C5a:

Etapa a): preparación de 20 µl de IgG probadas con 50 mg/ml en un tampón PBS-BSA al 1 % (muestra A) y de 80 µl de suero humano nativo diluido al 25 % en PBS-BSA al 1 % (muestra B).

Etapa b): mezcla de la muestra A con la muestra B. Todos los tubos de mezcla se mantienen en una mezcla agua/hielo hasta la incubación.

Para cada muestra, se realizan 5 pruebas independientes de activación de C5a:

- La activación máxima del complemento (control positivo) se obtiene al sustituir la muestra A que comprende las IgG probadas por unos LPS *E. Coli* de serotipo 0127:B8 purificados mediante la extracción con fenol (10 mg/ml);
- Se realiza un control negativo con únicamente tampón PBS-BSA.

Se incuban las mezclas 1 hora a 37 °C.

Etapa c): se detienen las reacciones colocando los tubos en hielo y añadiendo 1 µl de EDTA en 100 mM.

Etapa d): después de la incubación y el enfriamiento, se mide la liberación del fragmento C5a por triplicado para

cada tubo mediante una prueba ELISA:

- Dilución de cada mezcla: 1/50 en PBS/BSA al 1 %.
- Anticuerpos para el recubrimiento: 0,4 µg/ml - 100 µl / Anticuerpo para el revelado: 100 ng/ml - 100 µl.

La densidad óptica se mide para cada mezcla por medio de un lector de microplacas (Perkin) adaptado al sistema de revelado asociado al anticuerpo. Puede tratarse tanto de un lector en lo visible en el marco de un revelado clásico HRP-OPD como de un lector de fluorescencia si el anticuerpo está injertado con un grupo fluorescente.

Resultados: el porcentaje de activación del complemento se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{prueba} - \text{control negativo}] / [\text{activación máxima del complemento} - \text{control negativo}] * 100$$

Para cada mezcla, se mide la media obtenida para las 5 pruebas independientes y la desviación estándar.

Ejemplo 2: evaluación de la activación máxima del complemento mediante diferentes LPS

El protocolo del ejemplo 1 se utiliza para medir la activación máxima del complemento de los diferentes LPS siguientes:

LPS A: LPS de *E. Coli* de serotipo 0127:B8 purificados mediante cromatografía intercambiadora de iones.

LPS B: LPS de *E. Coli* de serotipo K-235.

LPS C: LPS de *Salmonella enterica* de serotipo *typhimurium*.

LPS D: LPS de *Klebsiella pneumoniae*.

LPS E: LPS de *E. Coli* de serotipo 0127:B8 extraídos con ácido tricloroacético.

LPS F: LPS de mutante de *Shigella flexneri*.

LPS de referencia: LPS de *E. Coli* de serotipo 0127:B8 purificados mediante la extracción con fenol.

Se evalúa la cantidad de fragmento C5a liberado en los días 1 a 5 para cada mezcla.

En la figura 1 se presentan los resultados. Para cada uno de los LPS A a F figuran sucesivamente las densidades ópticas (DO) obtenidas en D1, D2, D3, D4 y D5.

Para el LPS de referencia, las DO obtenidas durante cada medición para los 5 días se dan sucesivamente (p. ej. D1: 1ª medición, 2ª medición y 3ª medición del triplicado; D2: 1ª medición, 2ª medición y 3ª medición del triplicado... hasta el D5: 1ª medición, 2ª medición y 3ª medición del triplicado).

Los resultados demuestran que el LPS de referencia forma parte de aquellos que activan enormemente C5a, y esto de forma constante a lo largo del tiempo.

Ejemplo 3: medición de la activación del complemento mediante unas IVIG

Protocolo:

El protocolo del ejemplo 1 se utiliza para medir el porcentaje de activación de una IgNG y de diferentes IVIG comerciales.

La IgNG (ClairYG) se obtiene de acuerdo con el procedimiento desarrollado por la solicitante en el ejemplo 1 de la solicitud de patente internacional WO 2007/077365.

También se prueban 4 IVIG comerciales, que son:

IVIG1 = Octagam® comercializadas por Octapharma;

IVIG2 = Gammagard® comercializadas por Baxter;

IVIG3 = Gamunex® comercializadas por Talecris;

IVIG4 = Privigen® comercializadas por CSL Behring.

Para la prueba ELISA se cubren unas placas microperforadas con 100 µl de anticuerpos anti-C5a con 0,4 mg/ml en un tampón que comprende carbonato 0,1 M, pH 9,6, toda una noche a 4°C. Después de la saturación con PBS + un 1 % de BSA, las muestras y controles se diluyen en el tampón de saturación, se depositan sobre una placa y se incuban 2 horas a 20 °C. A continuación se añade el anticuerpo policlonal biotinilado y se revela con estreptavidina acoplada a una peroxidasa. La absorbancia en 492 nm se mide con un lector ELISA (Bio-Tek instrument). Se obtiene el Porcentaje de Activación del Complemento de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$[\text{prueba} - \text{control negativo}] / [\text{activación máxima del complemento} - \text{control negativo}] * 100$$

Para cada muestra el resultado corresponde a la media de las 5 activaciones independientes.

Resultados:

En la figura 2 se presentan los resultados.

5

Es evidente que el porcentaje de activación de C5a mediante ClairYg es significativamente más bajo (aproximadamente un 15 %), lo que sugiere, de manera significativa, una mejor tolerancia de este IVIG comparado con los 4 IVIG comerciales.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de medición de la activación del complemento mediante inmunoglobulinas G, que comprende las siguientes etapas:

- a) preparación de una muestra A de inmunoglobulinas G (IgG), y de una muestra B que comprende suero nativo, diluyéndose dicho suero nativo eventualmente en una solución tampón;
- b) mezcla de la muestra A con la muestra B en una proporción "cantidad de IgG en A, en gramos" : "volumen de suero nativo en B, en litros" comprendida entre 30 y 75, a una temperatura comprendida entre 2 °C y 6 °C, y a continuación incubación de la mezcla reactiva obtenida a una temperatura comprendida entre 35 °C y 40 °C durante un tiempo comprendido entre 30 minutos y 2 horas;
- c) enfriamiento de la mezcla reactiva obtenida al final de la etapa b) a una temperatura comprendida entre 0 °C y 4 °C, y en presencia de EDTA;
- d) medición de la cantidad de fragmento C5a en la mezcla reactiva enfriada obtenida en c).

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la proporción "cantidad de IgG en A, en gramos" : "volumen de suero nativo en B, en litros" de la etapa b) está comprendida entre 35 y 70.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** la proporción "cantidad de IgG en A, en gramos" : "volumen de suero nativo en B, en litros" de la etapa b) está comprendida entre 40 y 65.

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, **caracterizado por que** la proporción "cantidad de IgG en A, en gramos" : "volumen de suero nativo en B, en litros" de la etapa b) está comprendida entre 45 y 60.

5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** la incubación de la etapa b) se hace a una temperatura de aproximadamente 37 °C, durante un tiempo comprendido entre 45 minutos y 1 hora.

6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** el EDTA se utiliza en la etapa c) en una concentración comprendida entre 50 mM y 200 mM.

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** el EDTA se utiliza en la etapa c) en una concentración de aproximadamente 100 mM.

8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado por que** la muestra A es una muestra de IVIG.

9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** el suero nativo de la muestra B es un suero humano de grupo sanguíneo AB+.

10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por que** comprende una etapa e) de comparación de la cantidad obtenida en d) con la cantidad obtenida al sustituir la muestra A por unos lipopolisacáridos (LPS) de *E. Coli* de serotipo 0127:B8 purificados mediante la extracción con fenol.

11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por que** comprende una etapa e) de medición del porcentaje de activación del complemento, obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{prueba} - \text{control negativo}]}{[\text{activación máxima del complemento} - \text{control negativo}]} * 100$$

en la que:

"prueba" es la cantidad de fragmento C5a medida en la mezcla reactiva probada;

"control negativo" es la cantidad de fragmento C5a medida en la mezcla reactiva en la que se ha sustituido la muestra A por la disolución tampón;

"activación máxima del complemento" es la cantidad de fragmento C5a medida en la mezcla reactiva en la que se sustituye la muestra A por unos lipopolisacáridos (LPS) de *E. Coli* de serotipo 0127:B8 purificados mediante la extracción con fenol.

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, **caracterizado por que** la proporción "cantidad de LPS, en gramos" : "volumen de suero nativo en B, en litros" está comprendida entre 6 y 15.

13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado por que** la proporción "cantidad de LPS, en gramos" : "volumen de suero nativo en B, en litros" está comprendida entre 7 y 14.

14. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 o 13, **caracterizado por que** la proporción "cantidad de LPS, en gramos" : "volumen de suero nativo en B, en litros" está comprendida entre 8 y 13.

15. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado por que** la etapa d) de medición de la cantidad de fragmento C5a se realiza mediante una prueba ELISA.

Figura 1

DO de los diferentes LPS

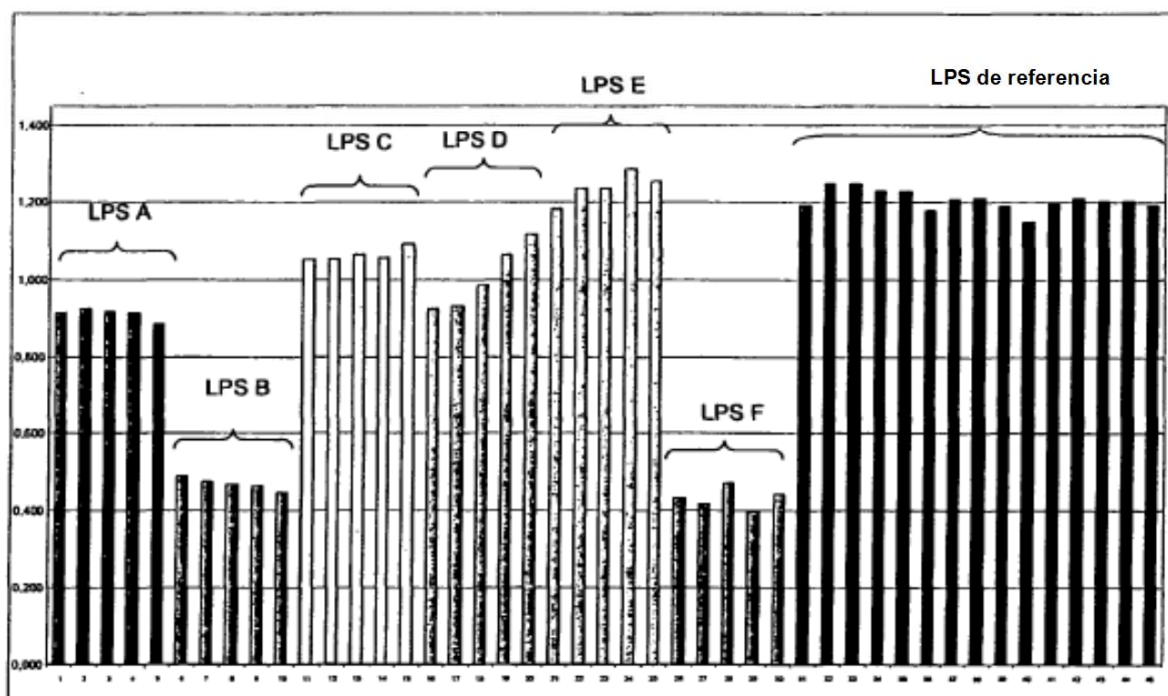


Figura 2

