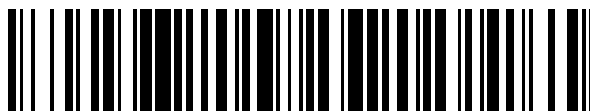


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 422**

51 Int. Cl.:

G01N 33/564 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2012 E 12816122 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2739976**

54 Título: **Identificación de anticuerpos atípicos en sangre y productos sanguíneos humanos**

30 Prioridad:

21.12.2011 US 201161578290 P

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

14.10.2016

73 Titular/es:

GRIFOLS, S.A. (100.0%)

C/ Jesús y María, 6

08022 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

ZERVOS, CLARK y

HOTTA, JOANN

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 586 422 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

Identificación de anticuerpos atípicos en sangre y productos sanguíneos humanos

5 SECTOR TÉCNICO

En la presente invención se dan a conocer métodos para identificar anticuerpos atípicos en sangre y productos sanguíneos.

10 TECNICA ANTERIOR

El Documento D1 (WO2008/033164 A1) da a conocer un método que se puede utilizar para detectar anticuerpos atípicos como Rho (D), Kell (K), Duffy (Fya), y hr' (c) en sangre basado en el uso de al menos dos fases líquidas en contacto fluido y con diferentes densidades para la separación de materiales de interés de materiales que no son de interés.

15 ANTECEDENTES

Se han identificado anticuerpos humanos naturales que provocan respuestas pirogénicas durante las pruebas de pirógeno de USP. Algunos donantes humanos producen de manera natural estos "anticuerpos atípicos", quizás como resultado de la exposición a conejos, roedores o insectos parasíticos alimentándose en dichos animales huésped (es decir, pulgas). Los anticuerpos atípicos son anómalos y no comunes, pero no son dañinos para los seres humanos. Los anticuerpos atípicos pueden reaccionar de manera cruzada con antígenos de glóbulos blancos de conejo y pueden provocar una respuesta pirogénica durante las pruebas de pirógeno de conejo. Sin embargo, la respuesta pirogénica es un resultado de "falso positivo" porque otros métodos, tales como los ensayos de lisado de amebocitos de limulus (LAL), mostraron que las muestras de plasma sospechosas que producen respuestas pirogénicas en los ensayos con conejos no contienen endotoxinas. Además, los resultados de pruebas de pirógeno in vitro (también conocidas como pruebas de activación de monocitos) indican la ausencia de pirógenos que no son endotoxinas. Por consiguiente, los anticuerpos atípicos en sangre humana o plasma provocan resultados erróneos en pruebas de pirógenos de conejo y pueden dar lugar a la eliminación de sangre o plasma de un individuo o grupos que en una prueba producen un falso positivo como "pirogénicos".

Los métodos dados a conocer en la presente invención permiten la identificación de muestras de sangre o plasma que contienen anticuerpos atípicos que dan lugar a falsos positivos en ensayos de pirógenos. Este método es ventajoso porque las muestras que contienen anticuerpos atípicos se pueden eliminar antes de agruparse con otra sangre o plasma y contaminar el grupo. Por consiguiente, el método reduce el coste de fabricación previniendo la contaminación innecesaria de los grupos de sangre o plasma con muestras que parecen "pirogénicas" debido a la presencia de anticuerpos atípicos. Los métodos de evaluación de alto rendimiento dados a conocer en la presente invención permiten la identificación de muestras sospechosas de falsos positivos. Dichas muestras se pueden descartar antes de agruparse con otras muestras y evitar la contaminación del grupo con anticuerpos atípicos.

40 CARACTERÍSTICAS RESUMIDAS DE LA INVENCION

En la presente invención se dan a conocer métodos para identificar anticuerpos atípicos en sangre y productos sanguíneos.

Un aspecto dado a conocer en la presente invención es un método para identificar anticuerpos reactivos atípicos en un proceso de fabricación de productos sanguíneos, en el que los anticuerpos reactivos atípicos dan lugar a falsos positivos en el ensayo de pirógenos en conejo, comprendiendo el método: (a) obtener una muestra de sangre o plasma; (b) analizar la muestra y un control utilizando uno o más entre aglutinación celular, microscopía de fluorescencia, inmunoprecipitación, inmunodifusión, inmunofluorescencia, ELISA, citometría de flujo, FACS o transferencia Western a fin de determinar si la muestra contiene anticuerpos atípicos que tienen reactividad cruzada con antígenos de glóbulos blancos de conejo; (c) comparar los resultados de la muestra y la prueba de control; (d) determinar si la muestra contiene anticuerpos atípicos reactivos, y; (e) interceptar una unidad de sangre o plasma que era la fuente de la muestra si la muestra contiene anticuerpos atípicos reactivos.

Otro aspecto dado a conocer en la presente invención es un método para identificar anticuerpos reactivos atípicos en un proceso de fabricación de productos sanguíneos, en el que los anticuerpos reactivos atípicos dan lugar a falsos positivos en el ensayo de pirógenos en conejo, tal como se mencionó anteriormente, en el que en la etapa (b) la muestra y un control se analizan utilizando un ensayo de aglutinación celular.

Otro aspecto dado a conocer en la presente invención es un método para identificar anticuerpos reactivos atípicos en un proceso de fabricación de productos sanguíneos, en el que los anticuerpos reactivos atípicos dan lugar a falsos positivos en el ensayo de pirógenos en conejo, tal como se mencionó anteriormente, en el que en la etapa (b) la muestra y un control se analizan utilizando citometría de flujo.

Otro aspecto dado a conocer en la presente invención es un método para identificar anticuerpos reactivos atípicos en un proceso de fabricación de productos sanguíneos, en el que los anticuerpos reactivos atípicos dan lugar a falsos positivos en el ensayo de pirógenos en conejo, tal como se mencionó anteriormente, en el que en la etapa (b) la muestra y un control se analizan utilizando transferencia Western.

Otro aspecto dado a conocer en la presente invención es un método para identificar anticuerpos reactivos atípicos en un proceso de fabricación de productos sanguíneos, en el que los anticuerpos reactivos atípicos dan lugar a falsos positivos en el ensayo de pirógenos en conejo, tal como se mencionó anteriormente, comprendiendo adicionalmente el método analizar la muestra y un control utilizando el ensayo de lisado de amebocitos de limulus (LAL).

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Microscopía de ensayos de aglutinación de WBC (glóbulos blancos) de conejo. Se incubaron el plasma de un donante X y de control con WBC de conejo y, a continuación, se observaron utilizando un microscopio. Fotomicrografías de luz (A, B) y contraste de fase (C, D) de glóbulos blancos de conejo incubados con plasma del donante X (A, C) o plasma de control (B, D). Se observó aglutinación con plasma del donante X (A, C), pero no con el plasma de control (B, D).

Figura 2: Microscopía de ensayos de aglutinación de WBC (glóbulos blancos) de ser humano. Se incubaron el plasma de un donante X y de control con WBC de ser humano y, a continuación, se observaron utilizando un microscopio. Fotomicrografías de luz (A, B) y contraste de fase (C, D) de glóbulos blancos de ser humano incubados con plasma del donante X (A, C) o plasma de control (B, D). No se observó aglutinación con plasma del donante X (A, C) o con el plasma de control (B, D).

Figura 3: Microscopía de contraste de fase y fluorescencia de la aglutinación de WBC de conejo y donante X. Se incubaron el plasma de un donante X y de control con WBC de conejo, se hicieron reaccionar con IgG antihumana marcada con fluoresceína y, a continuación, se observaron utilizando un microscopio de contraste de fase o fluorescencia. El panel (A) muestra una fotomicrografía de contraste de fase de WBC de conejo incubados con plasma del donante X. El panel (B) muestra una fotomicrografía fluorescente de WBC de conejo incubados con plasma del donante X y, a continuación, se trataron con IgG antihumana marcada con fluoresceína. Se observó una fluorescencia intensa en los grupos de células aglutinadas, lo que indica que la IgG humana del plasma del donante X era responsable de la aglutinación celular.

Figura 4: Microscopía de fluorescencia de ensayos de aglutinación de WBC de conejo. Se incubaron el plasma de un donante X y de control con WBC de conejo y, a continuación, se hicieron reaccionar con IgG antihumana marcada con fluoresceína. El panel (A) muestra una fluorescencia positiva de WBC de conejo. El panel (B) muestra los resultados con plasma de control.

Figura 5: Microscopía de fluorescencia de ensayos de aglutinación de WBC de conejo. Se incubaron el plasma de un donante X y de control con WBC de conejo, se hicieron reaccionar con IgG antihumana marcada con fluoresceína y, a continuación, se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia. El panel (A) muestra una fluorescencia positiva de WBC de conejo con IgG antihumana marcada con fluoresceína y una imagen con 40 aumentos de las células aglutinadas (panel inferior). Estos resultados indican que el plasma del donante X contiene IgG reactivas con antígeno de la superficie celular de WBC de conejo. El panel (B) muestra una fluorescencia débil observada con el plasma de control y una fotomicrografía de contraste de fase de los WBC de conejo que no muestran aglutinación (panel inferior).

Figura 6: Microscopía de fluorescencia de ensayos de aglutinación de WBC humanos. Se incubaron el plasma de un donante X y de control con WBC humanos, se hicieron reaccionar con IgG antihumana marcada con fluoresceína y, a continuación, se observaron utilizando microscopía de fluorescencia. Ni (A, donante X) ni (B, plasma de control) presentan una fluorescencia o aglutinación intensa (paneles inferiores), lo que indica que el plasma del donante X contiene IgG que no son reactivas a los antígenos de superficie celular de WBC humanos.

Figura 7: Histogramas de citometría de flujo por fluorescencia. Se incubaron WBC de conejo con plasma del donante X o de control, se hicieron reaccionar con IgG antihumana marcada con fluoresceína y, a continuación, se analizaron mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran la fluorescencia relativa observada. Los paneles A y B muestran dos experimentos separados. El plasma del donante X produjo la señal más amplia con una fluorescencia relativa, como mínimo, tres veces la del plasma de control. Véanse las **tablas 4 y 5** para resultados cuantitativos.

Figura 8: Histogramas de citometría de flujo por fluorescencia. Se incubaron WBC de humano con plasma del donante X o de control, se hicieron reaccionar con IgG antihumana marcada con fluoresceína y, a continuación, se analizaron mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran la fluorescencia relativa observada. Los paneles A y B muestran dos experimentos separados. El plasma del donante X no era significativamente diferente del plasma de control. Véase las **tablas 6 y 7** para resultados cuantitativos.

Figura 9: Análisis por Electroforesis y transferencia Western de muestras de aislados de plasma de un donante X que contienen IVIG-C pirogénico. Carril 1: marcadores de peso molecular; Carril 2: IGIV-C pirogénica (donante X); Carril 3: IGIV-C no pirogénica; Carril 4: suero de conejo; Carril 5: suero bovino fetal; Carril 6: suero de caballo. (A) Gel teñido con Instant Blue. (B) Control de transferencia Western (sin anticuerpo primario) sondado con inmunoconjugado de IgG antihumana y fosfatasa alcalina (IgG-AP). (C) Transferencia Western que utiliza aislados de plasma de un donante X que contienen IGIV-C pirogénica como anticuerpo primario e IgG antihumana-AP. (D) Transferencia Western que utiliza IGIV-C no pirogénica como anticuerpo primario e IgG antihumana-AP.

Figura 10: Análisis por Electroforesis y transferencia Western de muestras de aislados de plasma de un donante X que contienen IVIG-C pirogénica. Carril 1: marcadores de peso molecular; Carril 2: suero bovino fetal; Carril 3: suero de conejo; Carril 4: suero de conejo, diluido 1:5; Carril 5: suero de conejo, diluido 1:10; Carril 6: suero de conejo, diluido 1:50. (A) Control de transferencia Western (sin anticuerpo primario) sondado con inmunoconjugado de IgG antihumana y fosfatasa alcalina (IgG-AP). (B) Transferencia Western que utiliza aislados de plasma de un donante X que contienen IGIV-C pirogénica como anticuerpo primario e IgG antihumana-AP. (C) Transferencia Western que utiliza IGIV-C no pirogénica como anticuerpo primario e IgG antihumana-AP. (D) Gel teñido con Instant Blue.

Figura 11: El plasma de un donante X reacciona de forma cruzada con WBC de rata: Microscopía de fluorescencia de ensayos de aglutinación de WBC de rata. Se incubaron WBC de rata con plasma del donante X o de control, se hicieron reaccionar con IgG antihumana marcada con fluoresceína y, a continuación, se observaron mediante microscopía de fluorescencia. El panel (A) muestra una fluorescencia positiva y la aglutinación de EWBC de rata incubados con IgG antihumana marcada con fluoresceína y una imagen de 40 aumentos de las células aglutinadas (panel inferior). Estos resultados indican que el plasma de un donante X contiene IgG reactivas con antígenos de la superficie celular de WBC de rata. El panel (B) muestra una fluorescencia débil observada con el plasma de control y una imagen de 40 aumentos de los WBC de rata que no muestran aglutinación (panel inferior).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente invención se dan a conocer métodos para identificar anticuerpos atípicos en sangre y productos sanguíneos. Un individuo, referido en la presente invención como "donante X", donó plasma que se agrupó con otras unidades para la fabricación de productos proteicos bioterapéuticos. Durante el procesado, se analizó la pirogenicidad el plasma agrupado utilizando el ensayo para conejo de pirogenicidad de la USP. Inesperadamente, el plasma agrupado dió positivo como pirogénico en la prueba de USP para conejos. Ensayos adicionales localizaron el agente pirogénico en el plasma del donante X. Los ensayos de lisado de amebocitos limulus (LAL) mostraron que el plasma del donante X no estaba contaminado con endotoxinas bacterianas. En cambio, los ensayos dados a conocer en la presente invención demostraron que el plasma del donante X contenía anticuerpos atípicos que eran responsables de la respuesta pirogénica. De manera específica, los exámenes microscópicos de luz y fluorescencia mostraron que el plasma del donante X aglutinaba WBC de conejo y rata, pero no WBC humanos. La reactividad cruzada de los WBC de conejo era específica del donante X porque el plasma de los padres, hermanos e hijos del donante X no reaccionaba. Los experimentos de citometría de flujo fluorescente mostraron que el plasma del donante X contenía anticuerpos IgG reactivos con antígenos de la superficie celular de WBC de conejo y los experimentos de transferencia Western confirmaron la reactividad de las IgG con el suero de conejo. De manera colectiva, estos resultados sugieren que el donante X se puede haber expuesto a roedores o portadores de insectos de roedores que podrían haber inducido una inmunidad humoral reactiva de manera cruzada con WBC de conejo. De este modo, el plasma de algunos individuos puede dar positivo en las pruebas de pirógeno de USP para conejos, no porque esté contaminado de bacterias, sino porque contienen anticuerpos atípicos que son reactivos de manera cruzada con antígenos de WBC de conejo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Ensayos de pirógenos según la Farmacopea de los Estados Unidos (USP)

La actual Farmacopea de los Estados Unidos § 151 explica resumidamente el ensayo de pirógenos. La prueba implica la medición del aumento de la temperatura de los conejos después de la inyección intravenosa de una solución de prueba. Este ensayo se diseña para determinar si los productos pueden ser tolerados por el conejo de prueba en una dosis que no supere los 10 mL por kg inyectado de manera intravenosa en un periodo no superior a 10 minutos. Inicialmente, se inyectan tres conejos. Si alguno de los conejos muestra un aumento de la temperatura individual superior o igual a 0,5°C, se continúa con la prueba utilizando cinco conejos adicionales. Si tres o más de los ocho conejos muestran aumentos individuales en la temperatura superiores o iguales a 0,5°C y/o la suma de los aumentos de temperatura de ocho individuos supera los 3,3°C, el material bajo examen se considera pirogénico.

Se diluyó 1:100 una muestra de plasma del donante X o una muestra agrupada sin plasma del donante X en 10 mL de una solución de cloruro sódico (NaCl al 0,9%) y se inyectaron en las venas de la oreja de tres conejos maduros sanos. Se midieron por vía rectal las temperaturas de los conejos a los 10 minutos de la inyección. Los datos de las

temperaturas se muestran en la **tabla 1**. La muestra sin plasma del donante X no indujo un aumento de la temperatura en ninguno de los conejos. En cambio, cuando se analizó el plasma del donante X, se midieron aumentos de temperatura entre 1,1–1,2°C. Dado que el incremento total de la temperatura para los 3 conejos fue de 3,4°C, se consideró que el plasma del donante X era pirogénico y no existía la necesidad de extender las pruebas a otros 5 conejos.

Se capturaron las inmunoglobulinas en un grupo que contenía el 0% o el 10% de plasma del donante X utilizando una columna de proteína A y se analizó la pirogenicidad. La muestra sin plasma del donante X no indujo un incremento en la temperatura, pero las muestras que contenía plasma del donante X eran altamente pirogénicas. Estos resultados indicaron que la respuesta pirogénica en conejos podría estar relacionada con las inmunoglobulinas en el plasma del donante X.

Tabla 1: El plasma del donante X provoca respuestas pirogénicas en conejos				
Muestra	Incremento máximo de temperatura de pirogenos según USP (°C)			ΔT total
	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	
Plasma de donante X (1:100)	1,1	1,1	1,2	3,4
Plasma agrupado sin donante X (1:100)	0,0	0,0	0,0	0,0
Eluato de Mab agrupados con 10% de donante X	2,0	2,4	1,6	6,0
Eluato de Mab sin donante X	0,0	0,1	0,0	0,1

Ejemplo 2

Se realizaron una serie de experimentos utilizando plasma del donante X para entender mejor la naturaleza de su pirogenicidad.

Experimentos de aglutinación de glóbulos blancos y microscopía

Se realizaron experimentos de aglutinación para evaluar las interacciones entre el plasma del donante X y los glóbulos blancos (WBC) de conejo o ser humano. Se recogieron los WBC de la sangre completa de conejo y ser humano mediante centrifugación de gradiente de densidad utilizando Histopaque® (Sigma-Aldrich) y se suspendieron en solución salina tamponada normal complementada con BSA. A continuación, los WBC de conejo y ser humano se incubaron con plasma del donante X y de control en una microplaca de 96 pocillos. Después de la incubación y el lavado, se añadió IgG antihumana marcada con fluorescente y se incubaron las microplacas, se lavaron y se examinaron microscópicamente. Se examinó cada pocillo por la aglutinación utilizando microscopía de luz visible y contraste de fase y, a continuación, se observaron utilizando microscopía de fluorescencia (resultados discutidos en la sección siguiente).

Se observó una aglutinación significativa en los pocillos de ensayo que contenían plasma del donante X y WBC de conejo (**figuras 1A y 1C**), pero no en los pocillos de ensayo que contenía plasma del donante X y WBC humanos (**figuras 2A y 2C**). No se observó aglutinación en pocillos que contenían plasma de control y WBC de conejo (**figuras 1B y 1D**) o plasma de control y WBC humanos (**figuras 2B y 2D**). Estos resultados se reprodujeron en numerosos ensayos e indican que la IgG del donante X se une a WBC de conejo, pero no a WBC humanos. Véase la **figura 2**.

Durante varios experimentos de aglutinación, se observó citotoxicidad en muestras que contenían WBC de conejo y plasma del donante X, pero no en pocillos que contenían plasma de control y WBC de conejo, ni en pocillos que contenían WBC humanos con plasma del donante X o de control. La observación de que el plasma del donante X es tóxico para los WBC de conejo sugirió una unión específica de las inmunoglobulinas del donante X a estas células. Véanse las **figuras 1–3**.

Experimentos de microscopía fluorescente

Se realizaron experimentos de microscopía fluorescente en paralelo con los estudios de aglutinación y microscopía de luz descritos anteriormente y los resultados se presentan en la **tabla 2**. Los WBC de conejo eran intensamente fluorescentes en muestras incubadas con plasma del donante X (**figuras 4A y 5A**), en comparación con un grado relativamente débil de fluorescencia para muestras incubadas con plasma de control (**figura 4B**) o con sólo IgG antihumana marcada con fluorescente. Véanse las **figuras 4 y 5**. Estos hallazgos indicaron que la fluorescencia observada para WBC de conejo era específica para la IgG presente en el donante X. Se observó un grado débil de fluorescencia para WBC humanos incubados tanto con plasma del donante X como con plasma de control (**figura 6**) o con sólo la IgG antihumana marcada con fluorescente (sin plasma del donante X o de control añadido). **Figura 6B**.

Estos hallazgos indicaron que la fluorescencia observada con WBC humanos representaban una unión no específica, independiente de la presencia de la IgG del donante X o de control.

Tabla 2: Resultados de microscopía fluorescente

Origen del plasma	Huésped de WBC	IgG antihumana marcada con fluorescente	Valoración de la fluorescencia (0-4)
Donante X	Conejo	Sí	3-4
Control	Conejo	Sí	0-2
Ninguno	Conejo	Sí	0-1
Donante X	Humano	Sí	0-1
Control	Humano	Sí	0-1
Ninguno	Humano	Sí	0-1

5 **Ejemplo 3**

Experimentos de citometría de flujo

10 A efectos de cuantificar la unión a anticuerpo y la fluorescencia observada mediante el microscopio, se realizaron estudios de citometría de flujo. En estos experimentos, se incubaron WBC de conejo y ser humano con plasma de un donante X y de control y se lavaron antes de añadir e incubarse con IgG antihumana marcada con fluorescente. Las muestras celulares se lavaron, resuspendieron en solución salina tamponada normal hasta una concentración que variaba a desde aproximadamente 3×10^6 a 5×10^6 células/mL y se analizaron mediante citometría de flujo.

15 La **figura 7** contiene superposiciones de histogramas que muestran la intensidad fluorescente relativa de dos muestras de WBC de conejo diferentes incubadas con plasma del donante X o de control. Se incluyeron dos muestras adicionales como controles de ensayo, WBC de conejo no teñidos (células de control) y WBC de conejo tratados sólo con IgG antihumana marcada con fluorescente. La fluorescencia mediana de la muestra de WBC de conejo incubada con plasma del donante X fue de 3264 en el experimento 1 y 922 en el experimento 2 y, fue significativamente superior a la observada después de incubar WBC de conejo con plasma de control (fluorescencia mediana de 499 y 175 para los experimentos 1 y 2, respectivamente). Véanse las **tablas 3 y 4**. De este modo, aunque existía cierto solapamiento entre los WBC de conejo incubados con plasma del donante X y de control, existía una diferencia clara en la intensidad fluorescente. Estos resultados se correlacionaban perfectamente con los resultados de los estudios con microscopía, descritos anteriormente, en los que los WBC reaccionaban con plasma del donante X y producían una fluorescencia significativamente más intensa que los incubados con plasma de control.

Tabla 3: Datos del histograma de citometría de flujo que muestran la fluorescencia relativa de WBC de conejo incubados con plasma del donante X o de control

Experimento 1	Fluorescencia relativa (N = 20.0000)				
Tipo de célula	Promedio	Mediana	Modo	Modo de recuento	Desviación estándar
Plasma del donante X	4.507,4	3.263,8	10.000,1	1.632	3.688,4
Plasma de control	1.508,9	498,9	9.003,1	509	2.404,3
IgG antihumana sola	13,4	5,7	3,7	400	176,3
Célula de control	4,3	3,0	3,4	630	49,7

Tabla 4: Datos del histograma de citometría de flujo que muestran la fluorescencia relativa de WBC de conejo incubados con plasma del donante X o de control

Experimento 2	Fluorescencia relativa (N = 20.0000)	
Tipo de célula	Promedio	Mediana
Plasma del donante X	1752	922
Plasma de control	501	175
IgG antihumana sola	13	1
Célula de control	1	1

30 Los experimentos de citometría de flujo se repitieron con WBC humanos y los resultados se muestran en la **figura 8 y tablas 5 y 6**. Los WBC humanos incubados con plasma del donante X y plasma de control presentaban histogramas similares, lo que indica que no había una diferencia significativa en la intensidad fluorescente. Estos

resultados se correlacionaban con los resultados de los estudios de microscopía, descritos previamente, en que los WBC humanos tratados con plasma del donante X y de control producían un grado similar de fluorescencia. La muestra de WBC humanos teñida con sólo IgG antihumana marcada con fluorocromo también mostró un solapamiento significativo con muestras de plasma del donante X y de control y, de este modo, indicaban un grado significativo de unión no específica por el anticuerpo secundario.

5

Tabla 5: Datos del histograma de citometría de flujo que muestran la fluorescencia relativa de WBC humanos incubados con plasma del donante X o de control					
Experimento 3		Fluorescencia relativa (N = 20.0000)			
Tipo de célula	Promedio	Mediana	Modo	Modo de recuento	Desviación estándar
Plasma del donante X	1004,9	47,7	16,1	304	1739,0
Plasma de control	820,9	37,0	11,3	294	1472,1
IgG antihumana sola	381,8	17,4	9,4	332	785,5
Célula de control	5,6	2,8	2,9	695	2663,1

Tabla 6: Datos del histograma de citometría de flujo que muestran la fluorescencia relativa de WBC humanos incubados con plasma del donante X o de control		
Experimento 4		Fluorescencia relativa (N = 20.0000)
Tipo de célula	Promedio	Mediana
Plasma del donante X	174	7
Plasma de control	274	16
IgG antihumana sola	76	4
Célula de control	1	1

En resumen, los análisis de citometría de flujo mostraron la unión significativa de las inmunoglobulinas del donante X (es decir, IgG) a WBC de conejo en comparación con el plasma de control y una unión mínima a WBC humanos.

10

Ejemplo 4

Prueba complementaria de pirógenos de conejo

15

A efectos de evaluar una posible asociación genética para inmunoglobulinas de un donante X y su efecto en la pirogenidad de conejo, se realizaron ensayos de pirógeno según USP en sueros donados por parientes del donante X. También se analizó como control una muestra de suero del donante X. Dado que estudios previos demostraron que el plasma del donante X producía una respuesta significativa de pirógeno a diluciones 1:100, todas las muestras de prueba se diluyeron 1:100 en solución salina normal estéril (NaCl al 0,9%, USP, para inyección) antes del análisis de pirógenos de conejo. También se utilizó una alícuota de cada muestra en un ensayo LAL para examinar la contaminación por endotoxinas como fuente de la respuesta de pirógenos. Los resultados de pirógenos y LAL se presentan en la **tabla 7**.

20

Tabla 7: Resultados de la prueba de pirógenos según USP para el donante X y miembros de la familia inmediata				
Muestras de suero (dilución 1:100)	Resultados de pirógenos de conejo según USP (incremento máximo de temperatura en °C)			
	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	ΔT total
Donante X	1,0	0,3	0,6	1,9
Padre	0,0	0,1	0,0	0,1
Madre	0,0	0,2	0,0	0,2
Hermana 1	0,0	0,0	0,0	0,0
Hermano	0,0	0,0	0,0	0,0
Hermana 2	0,0	0,1	0,0	0,1
Hija 1	0,0	0,1	0,1	0,2
Hija 2	0,0	0,2	0,0	0,2
Hijo	0,0	0,1	0,0	0,1

25

El suero del donante X produjo un incremento significativo de temperatura en dos de los tres conejos de prueba, con un incremento total de la temperatura de 1,9°C. Esta respuesta concordaba con las pruebas previas con plasma del donante X. El suero de los parientes del donante X, que incluyen padres, hermanos e hijos no produjo incrementos significativos de temperatura. Los resultados del Ensayo de Lisado de Amebocitos Limulus (LAL) para todas las muestras fueron negativos, lo que indica que la endotoxina exógena no contribuía a las respuestas pirogénicas de conejo.

Ejemplo 5

Estudios de aglutinación de glóbulos rojos

Se analizó el plasma de un donante X con glóbulos rojos de conejo en una serie de experimentos de aglutinación para determinar si el plasma del donante X contiene inmunoglobulinas específicas para antígenos en RBC (glóbulos rojos) de conejo. La incompatibilidad entre las inmunoglobulinas del plasma del donante X y los RBV de conejo podía provocar potencialmente la hemólisis y pirogenicidad. Para estos estudios, se valoraron el plasma del donante X y de control frente a una suspensión de RBC de conejo. La suspensión se observó en tres puntos de tiempo: (1) inmediatamente; (2) después de una incubación de 30 minutos a 37°C; y (3) después de añadir suero de anti-globulina humana.

Tanto el plasma del donante X como de control produjeron una aglutinación intensa de RBC de conejo en todos los puntos de tiempo, y se observó un título equivalente para el donante X y el control positivo. Se observó una hemólisis a diluciones bajas tanto del donante X como del control positivo.

La presencia de inmunoglobulinas anti-A y/o inmunoglobulinas anti-B presentes en el plasma del donante X y del control podrían potencialmente reaccionar de forma cruzada con antígenos de RBC de conejo con epítomos similares a los antígenos A y B humanos. Por consiguiente, se preabsorbieron el plasma del donante X y del control con RBC A y/o RBC B humanos para eliminar la reacción cruzada de anticuerpos anti-a y anti-B. A continuación se analizó el plasma preabsorbido frente a los RBC de conejo tal como se ha descrito anteriormente. Tanto el plasma del donante X como el plasma del control produjeron una aglutinación intensa, similar a los resultados iniciales. No se observaron diferencias en la reactividad entre el plasma del donante X y el plasma del control. Estos resultados mostraron la presencia de anticuerpos en el plasma del donante X con una amplia reactividad cruzada con antígenos/epítomos en RBC de conejo. Además, estos resultados sugieren que un proceso mediado por RBC no es responsable de la respuesta pirogénica en conejos.

También se analizó el plasma del donante X por los anticuerpos para antígenos de RBC humanos utilizando un panel de identificación de anticuerpos de RBC. Se obtuvieron resultados negativos para todos los paneles, lo que confirma que el plasma del donante X no contiene aloanticuerpos clínicamente significativos.

También se realizó la determinación del fenotipo de antígeno en RBC del donante X, incluido el tiraje para antígenos de RBC que pertenecen a los sistemas grupos sanguíneos Rh, Kell, Duffy, Kidd, Lewis, MNS, P, y Luterano. Los RBC del donante X fueron de un fenotipo de RBC común, y no hubo resultados inusuales.

Ejemplo 6

Se analizaron los productos del plasma cascada abajo que contenían plasma de un donante X para identificar el factor responsable de la generación de la respuesta pirogénica. Utilizando transferencia Western se analizó la inmunoglobulina humana Globulina, intravenosa, que contenía caprilato al 10%/purificada por cromatografía (por ejemplo, IGIV-C al 10%, es decir, Gamunex®, Grifols Therapeutics Inc., anteriormente Talecris Biotherapeutics, Inc.) que se produjo de grupos de plasma que contenían el plasma del donante X.

Transferencia Western

Se aplicaron muestras de IGIV-C "pirogénica" producida de grupos de plasma que contienen plasma del donante X, IGIV-C no pirogénica producida de grupos de plasma sin plasma del donante X, suero de conejo, suero bovino fetal, y suero de caballo en 4 geles de SDS-PAGE reductoras al 4-20%. Un gel se tiñó con Instant Blue (**figura 9A**), mientras que los otros tres se transfirieron a membranas de PVDF (**figuras 9B–D**). Se hizo reaccionar una membrana con solo IgG anti-humana conjugada con fosfatasa alcalina (**figura 9B**). Las membranas restantes se hicieron reaccionar con IGIV-C pirogénica o con IGIV-C no pirogénica y, a continuación, con el conjugado de IgG anti-humana y fosfatasa alcalina (**figuras 9C–D**). Carril 1: marcadores de peso molecular; Carril 2: IGIV-C pirogénica (donante X); Carril 3: IGIV-C no pirogénica; Carril 4: suero de conejo; Carril 5: suero bovino fetal; Carril 6: suero de caballo.

El gel teñido con Instant Blue mostró que se cargaron en el gel cantidades comparables de suero de conejo, suero bovino fetal y suero de caballo. Carriles 4–6 en la **figura 9A**. La membrana teñida con sólo IgG anti-humana mostró que el anticuerpo secundario (IgG antihumana) era específico y sólo reaccionaba con IgG humana (IGIV-C pirogénica y no pirogénica). Carriles 2 y 3 en la **figura 9B**. La membrana reaccionó con IGIV-C pirogénica y el

conjugado de IgG anti-humana y fosfatasa alcalina mostró que la IGIV-C pirogénica reaccionaba fuertemente con suero de conejo y débilmente con suero bovino fetal y suero de caballo. Carriles 4–6 en la **figura 9C**. La membrana reaccionó con IGIV-C no pirogénica y el conjugado de IgG anti-humana y fosfatasa alcalina mostró que la IGIV-C no pirogénica reaccionaba débilmente con los tres sueros de prueba, incluyendo suero de conejo. Carriles 4-6 en la **figura 9D**. De manera colectiva, estos resultados indican que la IGIV-C pirogénica reacciona fuertemente con suero de conejo, mientras que la IGIV-C no pirogénica no lo hace.

Se aplicaron muestras de suero bovino fetal y varias concentraciones de suero de conejo en cuatro geles de SDS-PAGE al 4-20%. Se transfirieron tres geles en membranas de PVDF (**figuras 10A–C**), y un gel se tiñó con Instant Blue (**figura 10D**). Se hizo reaccionar una membrana con sólo IgG anti-humana conjugada con fosfatasa alcalina (**figura 10A**). Las membranas restante se hicieron reaccionar con IGIV-C pirogénica o con IGIV-C no pirogénica y, a continuación, con el inmunoconjugado de IgG anti-humana y fosfatasa alcalina (**figuras 10B–C**). Carril 1: marcadores de peso molecular; Carril 2: suero bovino fetal; Carril 3: suero de conejo; Carril 4: suero de conejo, diluido 1:5; Carril 5: suero de conejo, diluido 1:10; Carril 6: suero de conejo, diluido 1:50.

La transferencia Western fue negativa cuando la membrana se sondó con IgG anti-humana sola. **Figura 10A**. Sin embargo, cuando la IGIV-C pirogénica se utilizó como Ab primario, reaccionó de manera específica con suero de conejo no diluido y suero de conejo diluido 1:5 y 1:10. Véanse los carriles 3–5 en la **figura 10B**. La dilución 1:50 del suero de conejo no era reactiva (Carril 6). Sólo se detectó suero de conejo no diluido cuando se utilizó IGIV-C no pirogénica como anticuerpo primario. Carril 4 en la **figura 10C**. El gel teñido con Instant Blue mostró las cantidades relativas de suero bovino fetal y suero de conejo que se cargaron en los geles. Carriles 2–3 en la **figura 10D**. Sobre todo, estos resultados indican que la IGIV-C pirogénica contiene 10 veces más anticuerpos contra suero de conejo que la IGIV-C no pirogénica.

Ejemplo 7

Microscopía de fluorescencia y aglutinación de WBC de rata

Se aislaron WBC de rata de sangre completa mediante centrifugación de gradiente de densidad utilizando Histopaque®. Los WBC de rata se hicieron reaccionar con plasma del donante X tal como se ha descrito en el ejemplo 2 anterior. El plasma del donante X produjo una aglutinación y fluorescencia distinta con WBC de rata. Véase la figura 11.

Ejemplo 8

Resumen de resultados

Los resultados de los experimentos de microscopio (**figuras 1–6**) y citometría de flujo (**figuras 7–8**) indicaron que la IgG del donante X se unía fácilmente a WBC de conejo. Se demostró la unión a anticuerpo mediante la aglutinación y la intensidad fluorescente. Aunque el plasma de control produjo cierta fluorescencia con WBC de conejo, el grado de fluorescencia fue significativamente inferior que el observado con el donante X. El plasma de control no provocó aglutinación de WBC de conejo en ninguno de los experimentos, mientras que el plasma del donante X produjo aglutinación de manera sistemática. El plasma del donante X (IgG) no produjo aglutinación con WBC humanos en ninguno de los experimentos, lo cual indica que la IgG del donante X no se unió a WBC humanos.

La unión de la IgG del donante X a WBC de conejo es un probable desencadenante de la activación de WBC de conejo y la liberación de pirógenos endógenos (leucocíticos), lo cual causaba la respuesta a la fiebre observada.

Los ensayos de pirógeno de conejo realizados sobre la familia inmediata del donante X (es decir, padres, hermanos e hijos) fueron, de manera uniforme, negativos. **tabla 7**. Estos resultados indicaron que las únicas propiedades de la IgG del donante X, con respecto a la respuesta de temperatura de los conejos, no se basaban en un alelo dominante, sino que eran específicas de anticuerpo para el donante X.

Los experimentos con RBC de conejo demostraron que tanto el plasma del donante X como el plasma de control contenían anticuerpos con una amplia reactividad cruzada con un antígeno en RBC de conejo. El plasma del donante X y el plasma de control produjeron reacciones muy similares con RBC de conejo, lo que sugería que un proceso mediado por RBC no es responsable de la respuesta pirogénica en conejos.

Los experimentos de transferencia Western mostraron que la IGIV-C pirogénica (que contenía aislados de plasma del donante X) reacciona de manera intensa con suero de conejo, mientras que la IGIV-C no pirogénica no lo hace. Esto indica que la presencia de IgG atípicas del donante X en la IGIV-C pirogénica era responsable para obtener una respuesta pirogénica en la prueba de pirógenos según USP. Además, los experimentos de transferencia Western mostraron que la IGIV-C pirogénica contiene 10 veces más anticuerpos contra el suero de conejo que la IGIV-C no pirogénica. Esto indicaba un probable efecto aleatorio de los anticuerpos atípicos del donante X que provocaba las respuestas pirogénicas.

5 Los experimentos con glóbulos blancos de rata muestran que el plasma del donante X es capaz de reaccionar de forma cruzada con WBC de rata y provocar la aglutinación de los mismos. Estos resultados sugirieron que la exposición directa a ratas o la exposición indirecta por portadores de insectos de roedores (por ejemplo, pulgas), poseía conducir a una inmunidad de inmunoglobulina IgG "atípica" con una reactividad cruzada tanto con células de rata como de conejo.

Ejemplo 9

10 Ensayos de alto rendimiento

15 Se realizan experimentos ELISA, fluorescencia, o transferencia Western de alto rendimiento mediante la incubación de muestras de prueba en placas de 96 pocillos, 192 pocillos, o 384 pocillos o membranas, el lavado, bloqueo, y sondeo de las muestras utilizando inmunoconjugados de enzima o fluoróforo y, a continuación, el análisis de los resultados a través de la fluorometría, luminometría, densitometría, colorimetría o absorbancia de UV/visible, entre otros métodos de detección. Dichos ensayos de alto rendimiento permiten un análisis en línea de muestras de sangre o plasma o productos antes, durante y después del procesado y pueden eliminar muestras de reactivos, tales como las que contienen inmunoglobulinas atípicas, las cuales pueden producir falsos positivos en los resultados de pirógenos de los ensayos.

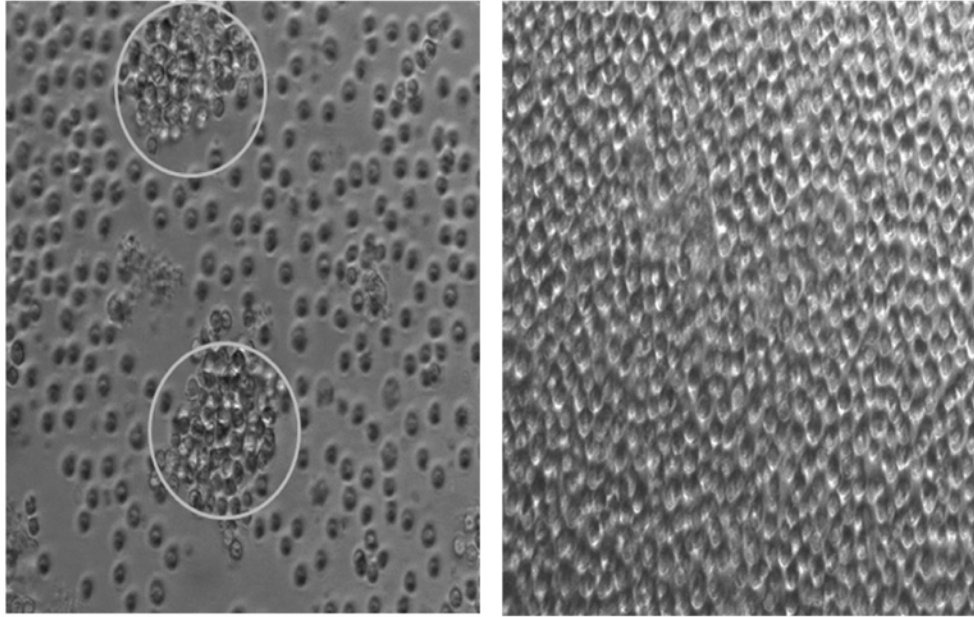
20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para identificar anticuerpos reactivos atípicos en un proceso de fabricación de productos sanguíneos, en el que los anticuerpos reactivos atípicos dan lugar a falsos positivos en el ensayo de pirógenos en conejo, comprendiendo el método:
- (a) obtener una muestra de sangre o plasma;
 - 10 (b) analizar la muestra y un control utilizando alguno o más de uno entre aglutinación celular; microscopia de fluorescencia, inmunoprecipitación, inmunodifusión, inmunofluorescencia, ELISA, citometría de flujo, FACS o transferencia Western a fin de determinar si la muestra contiene anticuerpos atípicos que tienen reactividad cruzada con glóbulos blancos de conejos;
 - (c) comparar los resultados de la muestra y la prueba de control;
 - (d) determinar si la muestra contiene anticuerpos atípicos reactivos, y;
 - 15 (e) interceptar una unidad de sangre o plasma que era la fuente de la muestra si la muestra contiene anticuerpos atípicos reactivos.
- y en el que los anticuerpos reactivos atípicos tienen reactividad cruzada con antígenos de glóbulos blancos de conejo y provocan una respuesta pirogénica durante el ensayo de pirógenos en conejos.
- 20 2. Método, según la reivindicación 1, en el que en la etapa (b) la muestra y un control se analizan utilizando un ensayo de aglutinación celular.
3. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) la muestra y un control se analizan utilizando citometría de flujo.
- 25 4. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa (b) la muestra y un control se analizan utilizando transferencia Western.
- 30 5. Método, según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente analizar la muestra y un control utilizando el ensayo de lisado de amebocitos de limulus (LAL).

Figura 1

A Donante X - Aglutinación Positiva **B** Control - Aglutinación Negativa



C Donante X - Aglutinación Positiva **D** Control- Aglutinación Negativa

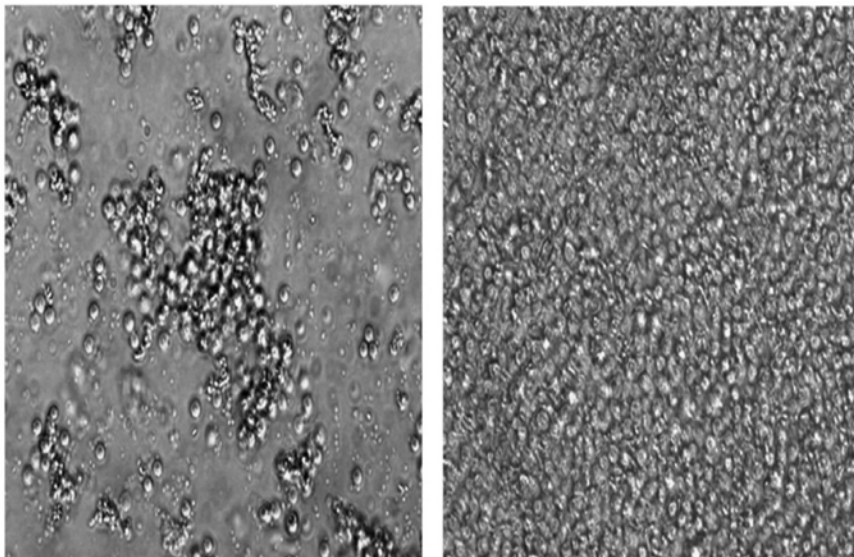
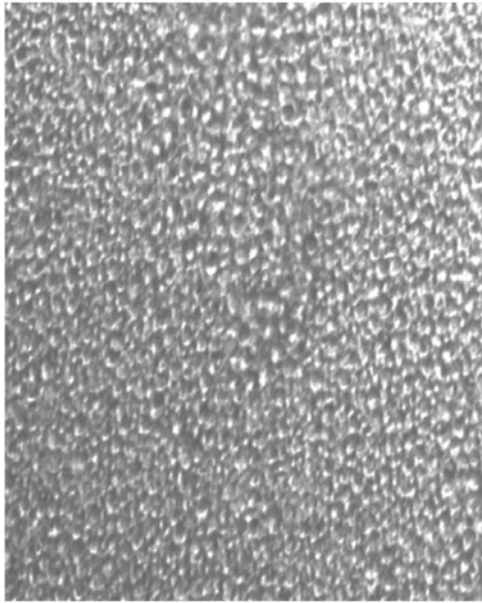
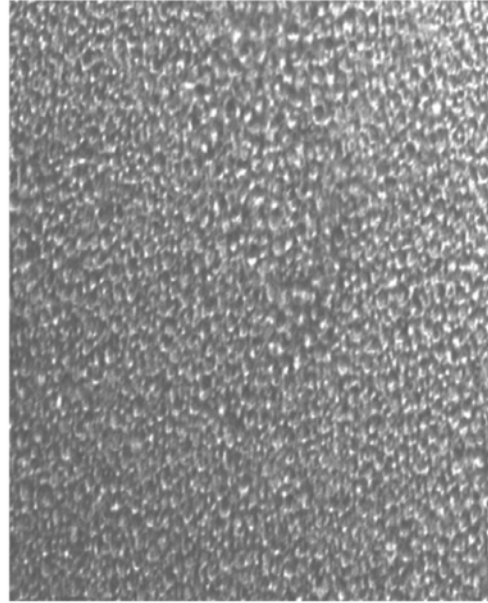


Figura 2

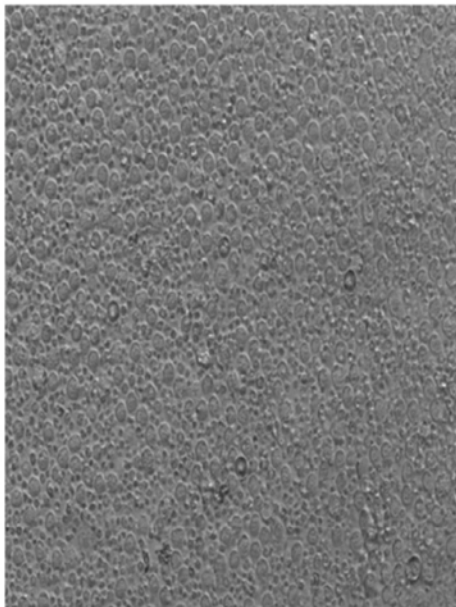
A Donante X - Aglutinación Negativa



B Control - Aglutinación Negativa



C Donante X - Aglutinación Negativa



D Control - Aglutinación Negativa

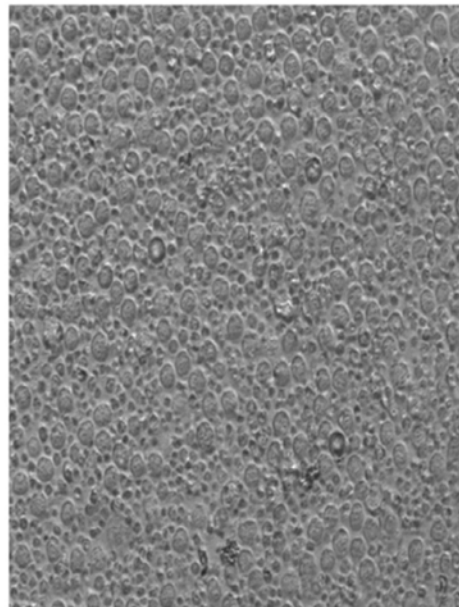


Figura 3

A Donante X - Aglutinación Positiva **B** Donante X - Aglutinación Positiva

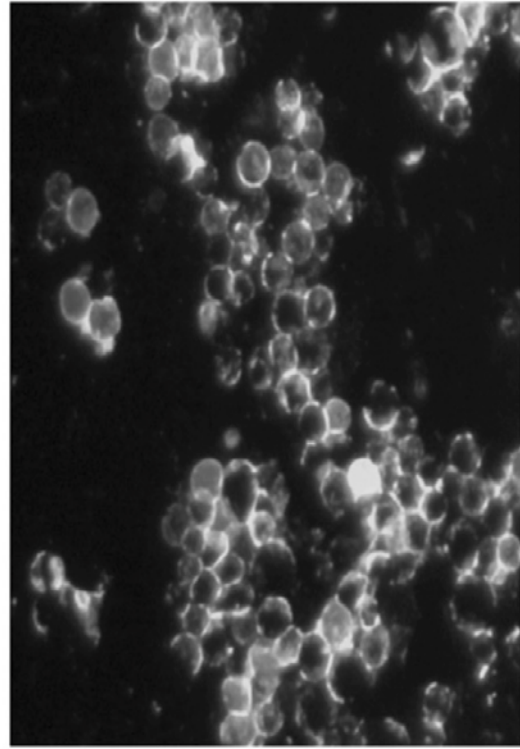
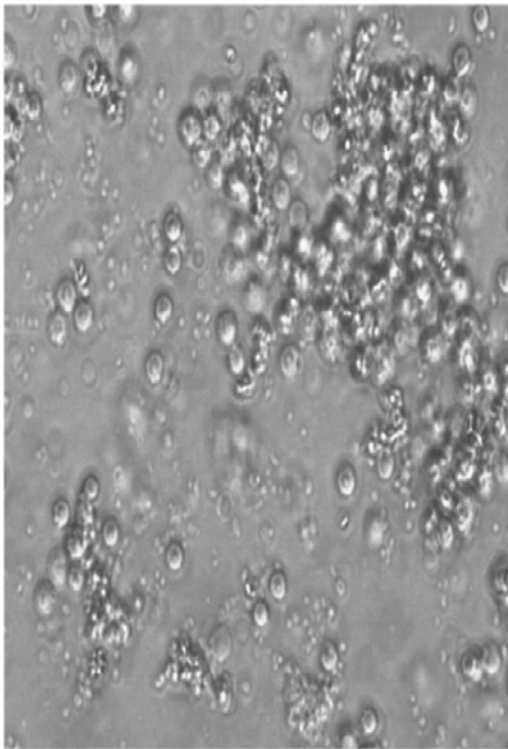


Figura 4

A Donante X - Fluorescencia Intensa



B Control - Fluorescencia Débil



Figura 5

A Donate X - Fluorescencia Intensa

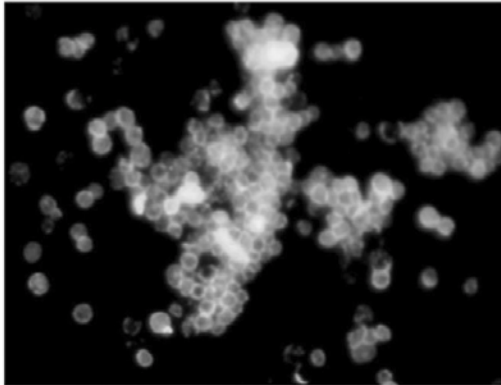
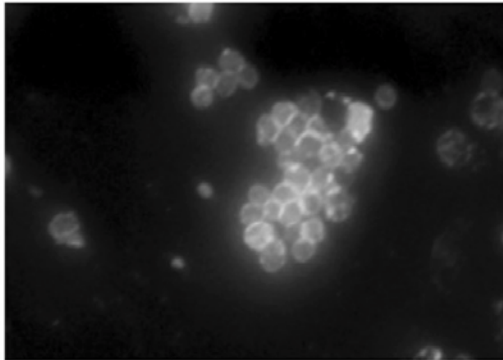


imagen con 40 aumentos



B Control - Fluorescencia Débil

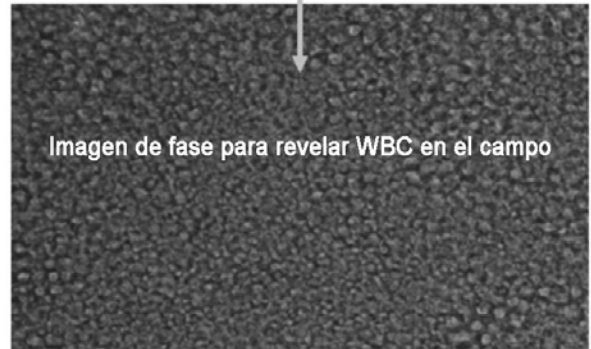
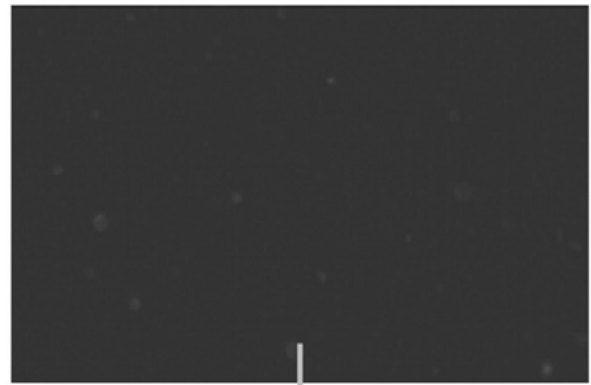
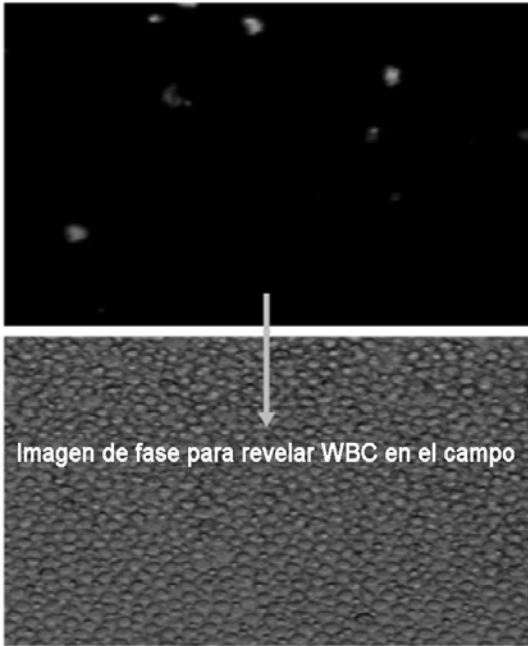


Imagen de fase para revelar WBC en el campo

Figura 6

A Donante X - Fluorescencia Débil



B Control - Fluorescencia Débil

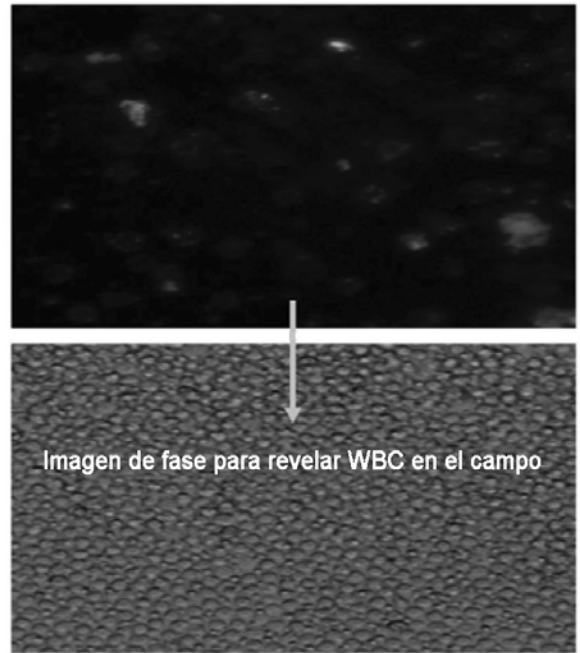


Figura 7

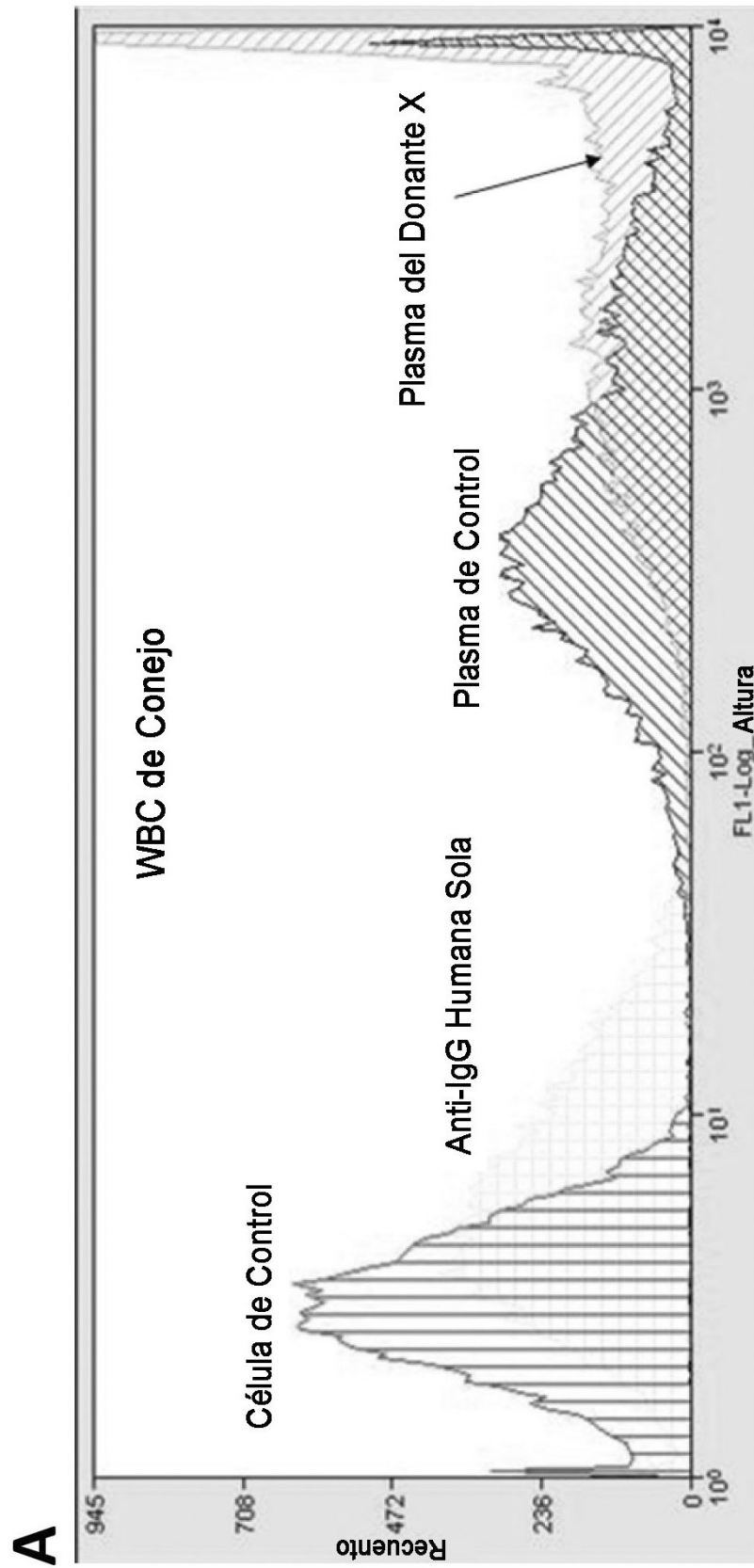


Figura 7

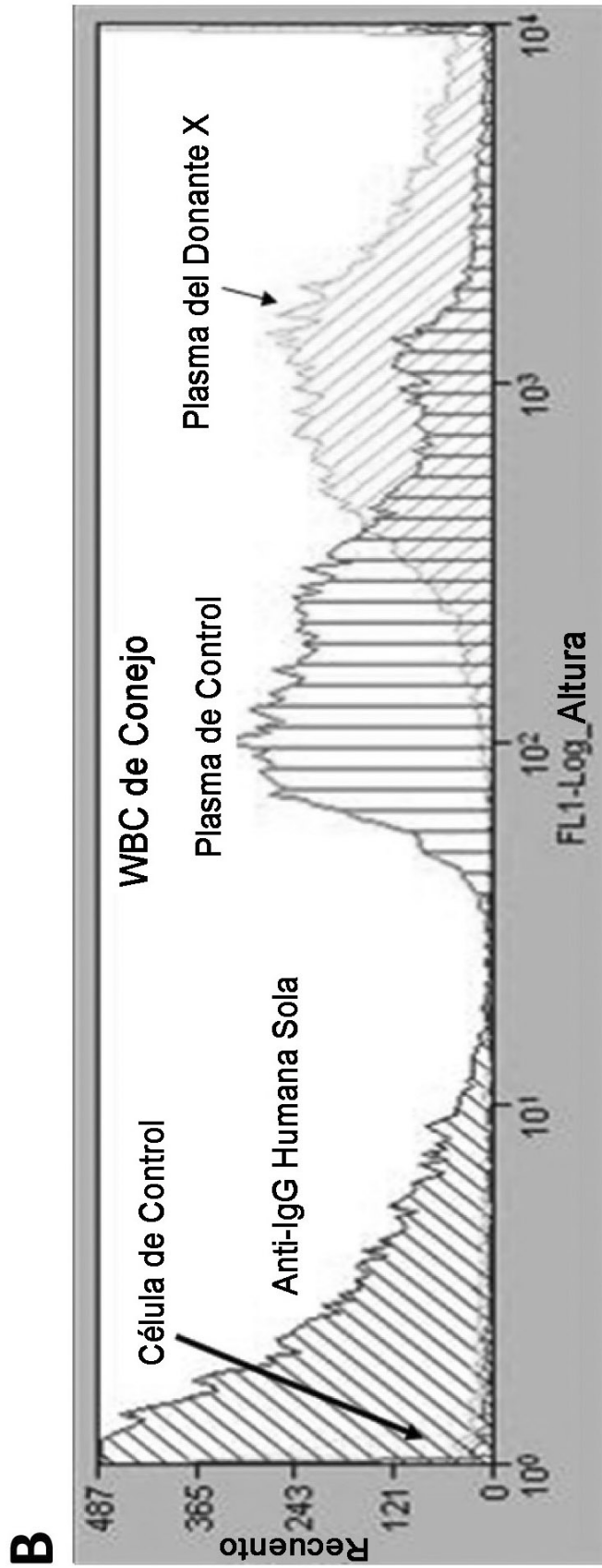


Figura 8

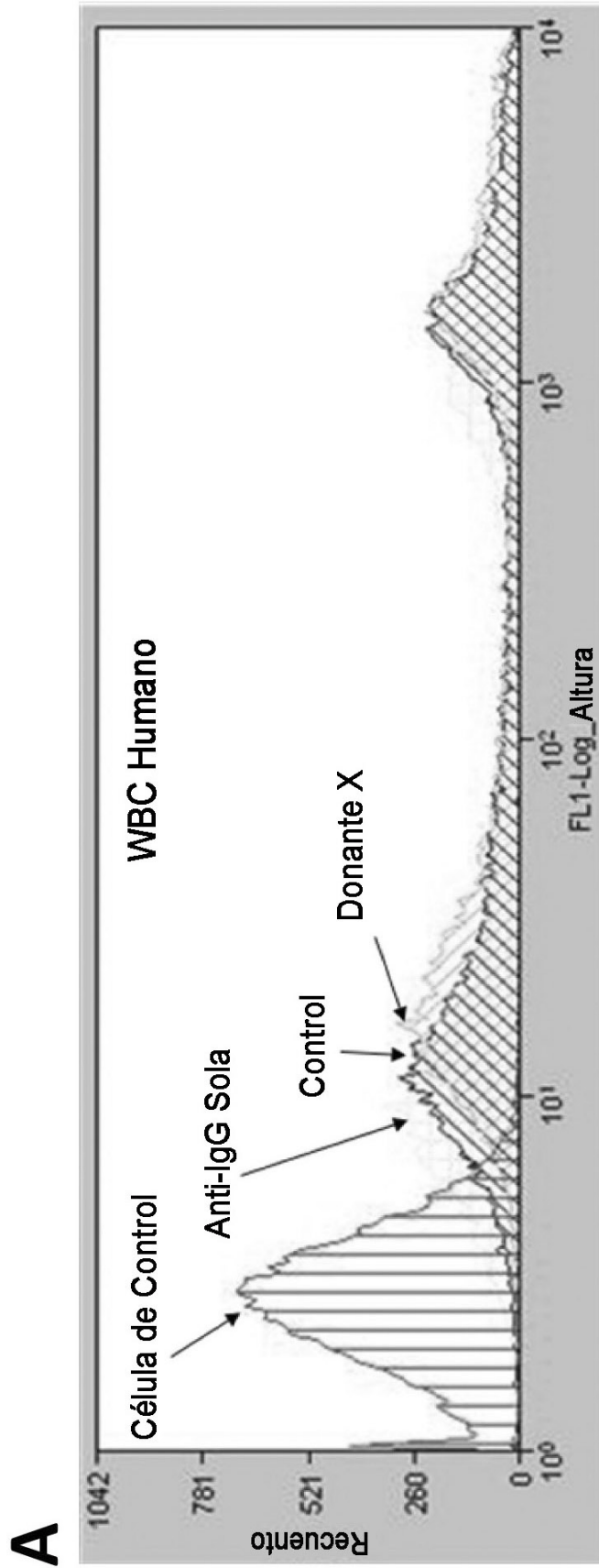


Figura 8

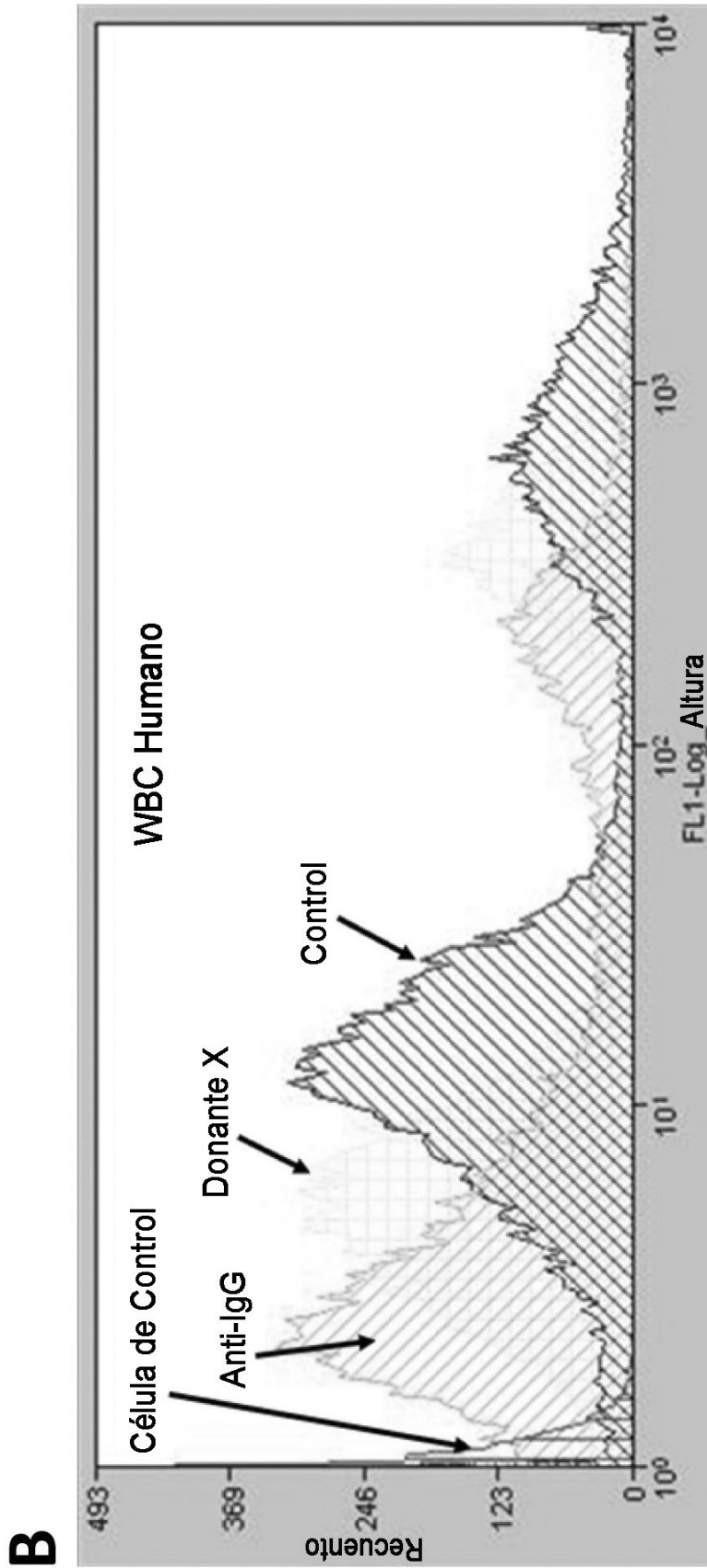
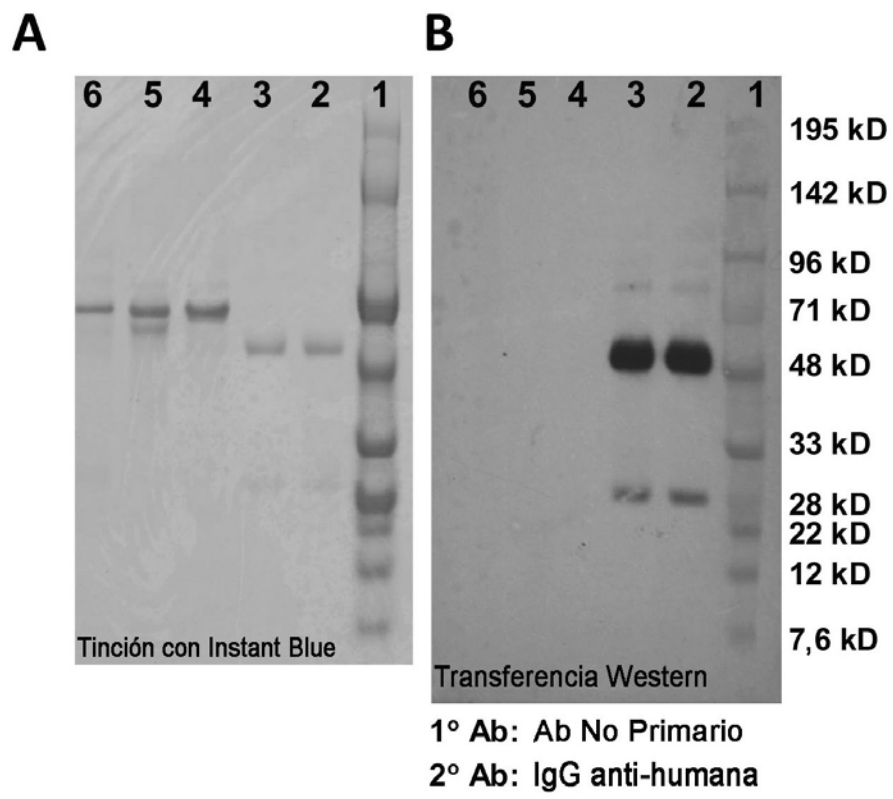


Figura 9



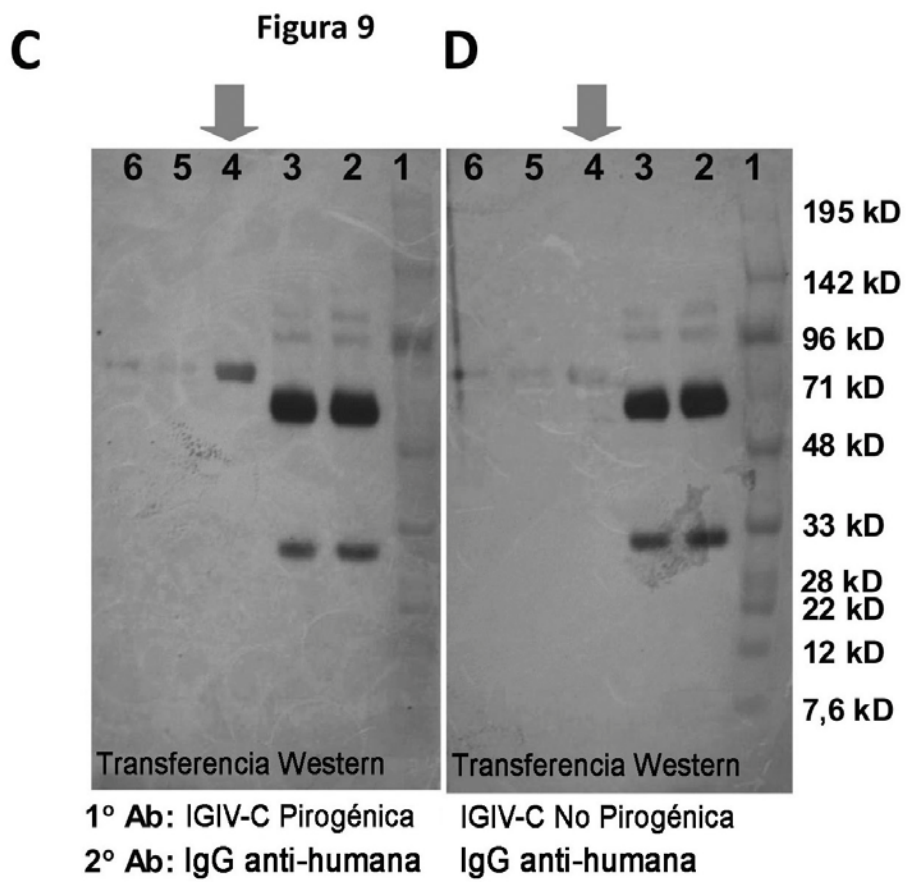
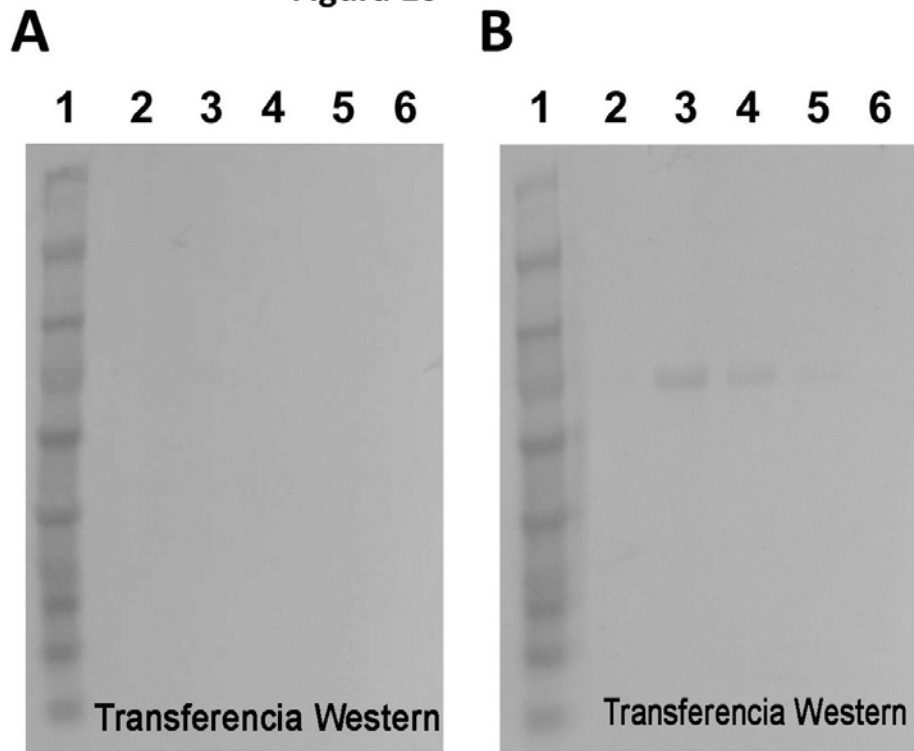


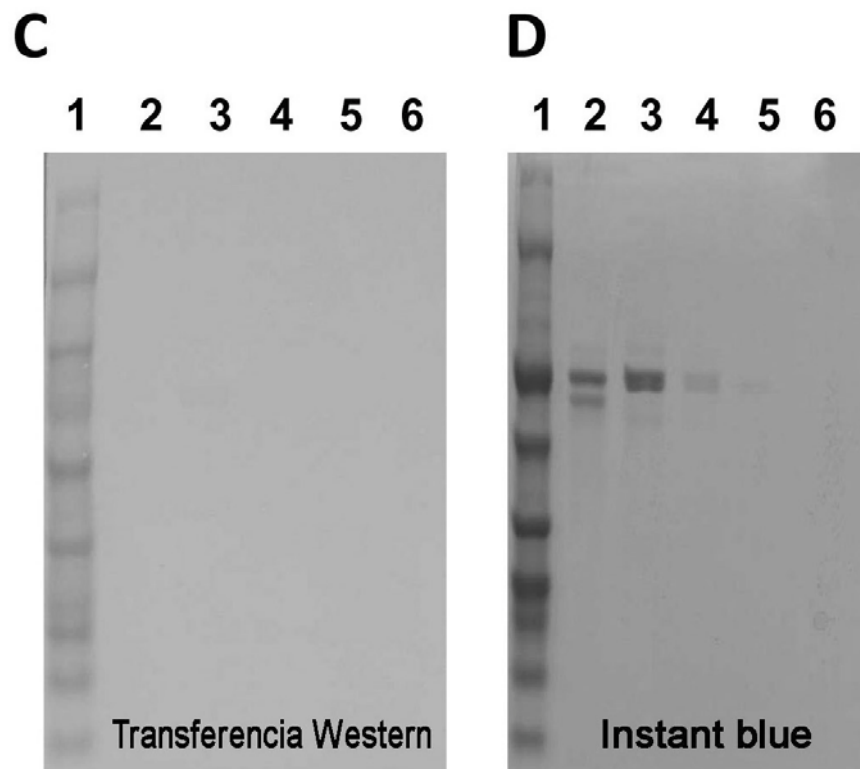
Figura 10



1° Ab: Ninguno
2° Ab: IgG anti-humana

IGIV Pirogénica
IgG anti-humana

Figura 10



IGIV No Pirogénica
IgG anti-humana

Figura 11

