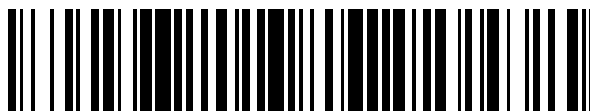


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 045**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2013** **E 13158552 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016** **EP 2641912**

54 Título: **Procedimiento para obtener una composición de IgG mediante tratamiento térmico**

30 Prioridad:

20.03.2012 ES 201230413

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

17.11.2016

73 Titular/es:

GRIFOLS, S.A. (100.0%)
C/ Jesús y María, 6
08022 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

RISTOL DEBART, PERE y
GRANCHA GAMON, SALVADOR

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 590 045 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para obtener una composición de IgG mediante tratamiento térmico

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de obtención de una composición de IgG a partir de una solución de IgG parcialmente purificada de plasma humano, en el que aplicando una etapa de tratamiento térmico intermedio y sin utilizar reactivos para la precipitación de agregados/polímeros y/o proteínas de alto peso molecular, se obtiene una eliminación prácticamente total de los polímeros de IgG generados durante el proceso. Además, dicho procedimiento presenta una elevada productividad, menores costes de producción y una implementación más fácil, en comparación con los procedimientos de la técnica anterior. Por otra parte, con la utilización de dicho procedimiento se proporciona estabilidad al producto final en líquido. La inmunoglobulina G (IgG) es el isotipo de inmunoglobulina más abundante en el suero humano (8-16 mg/ml) y constituye aproximadamente el 80% de todas las inmunoglobulinas. La IgG está indicada para el tratamiento de diversas enfermedades tales como la inmunodeficiencia primaria, en particular la agamaglobulinemia congénita y la hipogamaglobulinemia, la púrpura trombocitopénica idiopática, como adyuvante en el tratamiento de la enfermedad de Kawasaki y en el trasplante de médula ósea, la hipogamaglobulinemia asociada con leucemia linfocítica crónica, como parte del tratamiento de la infección por HIV en pacientes pediátricos, entre otras.

En la actualidad, existe una alta demanda de inmunoglobulina G (IgG) polivalente con amplio espectro de anticuerpos humanos y total funcionalidad (capacidad neutralizante, opsonización, vida media conservada), que presente moléculas intactas (integridad del fragmento cristalizable Fc) y una distribución normal de subclases de IgG igual o equivalente al plasma nativo, especialmente para las subclases minoritarias (IgG3 e IgG4). Las vías de administración terapéutica de la IgG pueden ser la vía intravenosa, subcutánea e intramuscular, incluso se puede administrar por otras vías menos convencionales tales como la vía oral, inhalada o tópica.

Sin embargo, la administración intravenosa ofrece las indicaciones terapéuticas más útiles, sea para el tratamiento de las inmunodeficiencias primarias o para la inmunodeficiencia común variable (déficit de subclases de IgG, de IgA) (Espanol, T. "Primary immunodeficiencies". *Pharmaceutical Policy and Law*. 2009; 11(4): 277-283), las inmunodeficiencias secundarias o adquiridas (por ejemplo, infección por virus tales como citomegalovirus, herpes zóster, inmunodeficiencia humana), y las enfermedades de origen autoinmune (púrpura trombocitopénica, síndrome de Kawasaki, como ejemplos) (Koski, C. "Immunoglobulin use in management of inflammatory neuropathy". *Pharmaceutical Policy and Law*. 2009; 11(4): 307-315).

De forma ideal, la IgG para uso intravenoso (IGIV) debe formularse a una alta concentración en líquido y preferentemente debe ser almacenable hasta aproximadamente 30°C para facilitar la conservación del producto y su infusión inmediata.

Se ha descrito que para reducir posibles reacciones de intolerancia de la IgG es necesaria la ausencia, o una cantidad no detectable, de inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina M (IgM), así como de aglutininas de grupo sanguíneo. También es imprescindible que el producto esté prácticamente libre de cualquier actividad enzimática, tanto por presencia de plasmina, o plasminógeno, como de precalicreína, o sus activadores, quininas o quininógeno, o factores de coagulación tales como factor XI/factor XIa, entre otros.

Por otro lado, la procedencia humana del plasma de partida para obtener la IgG polivalente obliga a reducir al mínimo el riesgo de infección por transmisión de virus o patógenos. Tal y como describieron Fernandes y otros (ES 500121) e Hirao, Y. y otros (EP 196761 y EP 253313), el tratamiento térmico en solución (líquido) de la IgG, o pasteurización, puede realizarse de forma eficaz en presencia de protectores contra la desnaturalización de la IgG (sacarosa, sorbitol, aminoácidos, por ejemplo). Para ello se lleva la solución a una temperatura aproximadamente de 60°C durante, como mínimo, unas 10 horas, activando o atenuando los patógenos más peligrosos. Estos patógenos pueden ser con envoltura lipídica tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la hepatitis B (VHB), o sin dicha envoltura, tales como el poliovirus, el virus de la hepatitis A (VHA), el parvovirus, entre otros (Uemura Y. y otros. "Inactivation and elimination of viruses during the fractionation of an intravenous immunoglobulin preparation". *Vox Sang*. 1989; 56: 155-161).

No obstante, la pasteurización, incluso en presencia de estabilizantes y en las mejores condiciones de proceso, conlleva inevitablemente la formación de agregados irreversibles de proteína de alto peso molecular tales como polímeros de IgG y/o de otras proteínas acompañantes, en mayor o menor proporción en dependencia de la pureza de la IgG de partida (Hirao, Y. y otros. *supra*; y Ristol, P. y otros. EP 1225180 y ES 2091161).

En la década de 1960-1970, la presencia de agregados irreversibles de alto peso molecular, denominados polímeros de IgG, fue asociada al consumo del complemento por activación del mismo (actividad anticomplementaria, ACA) durante la administración intravenosa de IgG, y éste fenómeno se vinculó a las graves reacciones de intolerancia o anafilaxis observadas (Barandum, S. y otros. *Vox Sang*. 7: 157-174, 1962). Por ello, las autoridades sanitarias regularon el contenido máximo de polímeros, o formas moleculares superiores a dímeros, de las IGIV hasta un límite del 3% (Eur.Ph. Monograph 6.3; y CMP Core SPC for human normal immunoglobulin for intravenous administration: CPMP/BPWG/859/95 rev.2). Esta consideración es especialmente importante para una formulación líquida, puesto

que el límite del 3% debe mantenerse igualmente hasta la fecha de caducidad del producto. Por tanto, existe la necesidad de conseguir una ausencia prácticamente total de dichos polímeros de IgG, tanto después de la pasteurización como en el producto final obtenido, para garantizar la inalterabilidad del producto a largo plazo y la máxima temperatura de conservación posible.

Actualmente, la mayoría de las IgG líquidas disponibles en el mercado y formuladas con aminoácidos, deben mantenerse a pH ácido para evitar la agregación (Uemura, Y. "Dissociation of aggregated IgG and denaturation of monomeric IgG by acid treatment". *Tohoku J. Exp. Med.*, 1983; 141: 337-349), preferentemente entre pH 4,0 - 5,0 (Tenold, R. y otros. US-4396608), y a una temperatura de 2-8°C si están estabilizadas con glicina 0,2 M ó 0,25 M tales como las conocidas con los nombres comerciales de Gamunex® (Grifols SA, España), Kiovig® o Gammagard® Liquid (ambas de Baxter, Estados Unidos), o hasta 25°C si se estabiliza con prolina 0,25 M tal como Privigen® (CSL Behring, Alemania), con el objetivo de minimizar la agregación molecular durante la conservación (Jolles, S. y otros. "Clinical uses of intravenous immunoglobulin" *Clin. Exp. Immunol.* 2005 October; 142(1): 1-11; Hooper, JA. "Intravenous immunoglobulins: evolution of commercial IVIG preparations". *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 2008; 28(4): 765-778).

Se ha comprobado que un pH excesivamente ácido durante un largo período de exposición favorece la fragmentación de la IgG, por ejemplo a un pH igual o inferior a 4,5 y una temperatura relativamente alta, por ejemplo a 30°C (Vermeer, A. y otros. "Thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein". *Biophys. J.* 2000; 78: 394-404; Shukla, A. y otros. "Strategies to address aggregation during protein A chromatography". *Bioprocess International*, May 2005). Así, por ejemplo, se ha reportado en la literatura que composiciones de IGIV al 10% formulada con L-prolina a pH $4,8 \pm 0,2$ son suficientemente estables en cuanto a agregación molecular, pero se observa una tendencia a la fragmentación con el tiempo de exposición. Así, a una temperatura de 25°C, los fragmentos son en promedio del 3,9% después de 36 meses (Cramer, M. y otros. "Stability over 36 months of a new liquid 10% polyclonal immunoglobulin product (IgPro10, Privigen®) stabilized with L-proline". *Vox Sang.* 2009. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2008.01143.x).

Se ha descrito que la formulación de IgG con polioles o polialcoholes, por ejemplo con maltosa y sorbitol, previene la agregación (Katakam, M. y otros: Aggregation of proteins and its prevention by carbohydrate excipients: Albumins and globulin. *J. Pharm. Pharmacol.* 1995; 47: 103-107), y debido a esta propiedad se han formulado soluciones estables de IgG hasta 25°C (con maltosa al 10%, nombre comercial Octagam®) y hasta 30°C (con sorbitol al 5%, nombre comercial Flebogamma® DIF), en un intervalo de pH ligeramente ácido entre 5,0 – 6,0 (Hirao, Y. y otros, patente EP-278422).

Sin embargo, la presencia en las formulaciones de IgG de algunos azúcares o derivados ha sido cuestionada en los últimos años (Szenczi, A. y otros.: The effect of solvent environment on formation and stability of human polyclonal in solution. *Biologicals*, 2006; 34(1): 5-14), habiéndose asociado la infusión de preparados de IgG con sacarosa con algunos casos de insuficiencia renal grave. Otras desventajas que pueden presentar algunas composiciones de inmunoglobulina con determinados azúcares (sacarosa) y algunos polioles a alta concentración (maltosa 10%), es la relativa capacidad para incrementar la viscosidad en sangre al infundir estas soluciones, habiéndose vinculado a algunos casos muy graves de trombosis intravascular e infarto agudo de miocardio cuando existe una patología previa o de riesgo en el paciente (Radosevich, M. y Burnouf, T.: Intravenous immunoglobulin G: Trends in production methods, quality control and quality assurance. *Vox Sang.*, 2009; 1-17; Katz, U. and Shoenfeld, Y.: Review: intravenous immunoglobulin therapy and thromboembolic complications. *Lupus*, 2005; 14(10): 802-808).

Por otra parte, se ha detectado que algunos productos comerciales de IGIV contienen enzimas procoagulantes activos, remanentes de su proceso de purificación, con un marcado efecto tromboembólico (TEE), habiéndose comprobado una asociación entre los TEE y la presencia de factores XI/XIa y/o de otros factores procoagulantes (por ejemplo, calicreína o similares). La anulación de la capacidad tromboembólica es un imperativo de obligado cumplimiento para la infusión de IGIV con las máximas garantías de tolerancia y seguridad.

Sin estar asociados a una teoría en particular, los inventores de la presente invención creen que las diferencias principales entre las IGIV comercializadas en la actualidad no solo son atribuibles a la formulación (aminoácidos, azúcares y polioles, y pH), sino también al procedimiento de obtención de la IgG, que afectaría a las condiciones finales de conservación del producto en líquido (temperatura-tiempo), por ejemplo, para evitar la agregación y la fragmentación durante su almacenamiento, entre otras características. Tal dependencia entre la estabilidad de las formulaciones líquidas de IgG y su procedimiento de purificación ha sido observada por otros autores (Cramer, M. y otros, supra).

En AGHAIE A ET AL, 2010 ("Preparation, purification and virus inactivation of intravenous immunoglobulin from human plasma", *HUMAN ANTIBODIES*, vol. 19, no. 1, p. 1-6) se da a conocer un procedimiento para obtener una composición de IgG a partir de IgG parcialmente purificada de plasma humano, que comprende las etapas de: (1) cromatografía de intercambio aniónico de la pasta de fracción II que contiene IgG; (2) diafiltración; (3) adición de estabilizantes (sorbitol y glicina); (4) pasteurización (tratamiento térmico); (5) diafiltración.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer un procedimiento de obtención de una preparación de IgG que supera los problemas del estado de la técnica anterior mencionados anteriormente. En el procedimiento según la presente invención se parte de un material que contiene IgG purificada por métodos convencionales, se purifica adicionalmente mediante un tratamiento térmico, también conocido como pasteurización, en unas condiciones específicas de estabilizantes, concentración de proteína, conductividad, pH, y concentración residual de reactivos de etapas de precipitación previas, que posibilita una reducción de las impurezas proteicas y enzimas proteolíticos. Esta reducción de impurezas y enzimas ocurre durante dicho tratamiento y/o en una etapa posterior de adsorción selectiva de las proteínas agregadas, pero en cualquier caso se utilizan exclusivamente estas dos etapas como purificación terminal, sin introducir técnicas de separación por precipitación.

En la técnica anterior se han utilizado a escala industrial una combinación de precipitación de los agregados/polímeros y las separaciones cromatográficas, tal y como describen, por ejemplo, Coval, L. (Patentes US-4093606 y US-4165370) y Uemura, Y. y otros (patentes ES-506679 y EP-246579), en las que se dan a conocer procedimientos de precipitación utilizando polietilenglicol (PEG), que es un método poco selectivo y causa unas elevadas pérdidas de recuperación de monómero/dímero de IgG (coprecipitación), que son muy variables según el procedimiento utilizado. Por ejemplo, si el tratamiento térmico se lleva a cabo en una solución de IgG que no está suficientemente purificada, la recuperación de IgG (monómero/dímero) suele hallarse entre el 70-80% (Uemura, Y. y otros. supra). En el caso de soluciones de IgG purificadas pueden obtenerse mejores resultados de recuperación con un 80-90%, pero para ello se requiere la utilización de técnicas de separación complejas como es la microfiltración en flujo tangencial (TFF), tal y como se ha descrito en la técnica anterior (Ristol, P. y otros, supra). Sin embargo, el proceso de TFF conlleva un elevado consumo de reactivos de precipitación (PEG), de estabilizante (sorbitol) y de agua para inyección, así como un número de operaciones de limpieza-desinfección a considerar cuando los equipos deben reutilizarse necesariamente. Además, conlleva un tiempo de proceso elevado, puede resultar de difícil manejo, los costes asociados son elevados en cuanto a consumibles y/o energía y la recuperación de monómeros/dímeros de IgG es siempre inferior al 90%. Los autores de la presente invención han desarrollado un procedimiento mediante el que se ha prescindido de la utilización de reactivos para la precipitación de agregados/polímeros y/o proteínas de alto peso molecular tal y como se ha descrito en la técnica anterior y, sorprendentemente, han obtenido una eliminación prácticamente total de los polímeros generados, presentando una elevada productividad, menores costes de producción y una fácil implementación en comparación con los procedimientos de la técnica anterior. Además, con la utilización de dicho procedimiento se consigue estabilidad del producto final en líquido, preferentemente formulado en presencia de aminoácidos o polialcoholes, y puede mantenerse en líquido a una temperatura de entre 2 y 30°C y a un pH igual o superior a 4,6 y hasta 5,8 durante, como mínimo, 1 año.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer un procedimiento de obtención de una composición de IgG a partir de una solución de IgG parcialmente purificada de plasma humano con un contenido de IgG mayor del 95% con respecto al total de proteínas, que comprende las etapas de:

- a) diafiltrar la solución de IgG parcialmente purificada;
- b) estabilizar la solución obtenida en la etapa a);
- c) tratar térmicamente la solución obtenida en la etapa b);
- d) adsorber de la solución tratada térmicamente en la etapa c) los agregados y/o polímeros de alto peso molecular de forma selectiva mediante cromatografía catiónica; y
- e) diafiltrar y formular la solución obtenida en la etapa d).

Mediante la utilización de este procedimiento se obtiene una reducción relevante del contenido de agregados/polímeros de alto peso molecular, es decir, superiores al dímero de IgG y otras proteínas inestables, dando lugar a una solución que contiene esencialmente monómeros/dímeros de IgG que puede formularse en un medio ligeramente ácido, y puede conservarse en líquido a temperatura ambiente sin apreciarse signos evidentes de inestabilidad, cumpliendo las especificaciones establecidas para su uso preferente por vía intravenosa, o por vías subcutánea o intramuscular.

El procedimiento según la presente invención se lleva a cabo a partir de una solución de IgG purificada del plasma humano con un contenido de IgG respecto al total de proteínas mayor del 95%, y más preferentemente mayor del 97%, tal como se determina mediante electroforesis en acetato de celulosa, tinción con negro amido y cuantificada de forma densitométrica, de acuerdo al método descrito en la Farmacopea Europea.

El presente procedimiento contempla como materiales de partida la utilización de fracciones ricas en IgG (separadas del fraccionamiento del plasma humano para la obtención de albúmina por métodos convencionales conocidos en la técnica), y luego su purificación adecuada para iniciar el proceso según la presente invención.

Hasta la fecha, y a escala industrial, continúa mayoritariamente utilizándose el fraccionamiento del plasma con etanol en frío, basado en el método 6 de Cohn (Cohn, E.J. y otros, Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components. J. Am. Chem. Soc. 1946; 68: 459-475) para la separación de una fracción rica en IgG. Esta fracción (Fr-II+III) o equivalente (Fr-I+II+III), que contiene la mayoría ($\geq 90\%$) de la IgG y del plasma con una pureza variable (normalmente entre el 35 y el 65% de IgG con respecto al resto de proteínas), debe purificarse más

extensivamente por precipitaciones con etanol según se conoce como método 9 de Cohn-Oncley (Oncley, J.L. y otros.: The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and beta-1 lipoprotein into subfractions of human plasma. J. Am. Soc. 1949; 71: 541-550), hasta obtener una fracción de inmunoglobulina concentrada (Fr-II, o sobrenadante de Fr-III concentrado). Otra alternativa viable es utilizar el método de Kistler-Nitschmann (Kistler, P. y Nitschmann, Hs. Large Scale Production of Human Plasma Fractions. Vox Sang. 1962; 7: 414-424) hasta el precipitado A (o precipitado A+I equivalente), y luego purificarse hasta obtener el precipitado GG, o bien hasta el sobrenadante concentrado (ultrafiltrado) del precipitado B. Por ambos procedimientos de precipitación con etanol puede obtenerse una solución de IgG (a partir de sobrenadante de Fr-III, Fr-I+III, Fr-II, GG precipitado o sobrenadante del precipitado B) que cumpla con las características mínimas de pureza de $\geq 95\%$ de IgG (por electroforesis en acetato de celulosa), y preferentemente $\geq 97\%$ de IgG, requerida para que pueda ser utilizada como material de partida en el proceso según la presente invención. Esto transforma una IgG que es aceptable para la vía intramuscular o subcutánea en un preparado tolerable por vía intravenosa.

De todos modos, hoy en día se aplican otras combinaciones preferentes para aumentar la pureza del material de partida (por ejemplo Fr-II+III o precipitado A), por ejemplo, por precipitación de los contaminantes mayoritarios y/o adsorción de los mismos por resinas aniónicas y/o adsorbentes inorgánicos (polietilenglicol, ácido octanoico, cromatografía de intercambio iónico, bentonita, perlita). Los documentos Ristol, P. y otros, EP-1225180; Lebing, W. y otros, EP-0893450; Teschner, W. y otros.: A new liquid, intravenous immunoglobulin product (IGIV 10%) highly purified by a state-of-the-art process. En Vox Sang. 2007; 92(1): 42-55 se hace referencia a procedimientos válidos de purificación por precipitación con etanol, PEG o ácido octanoico, combinados con cromatografía de intercambio iónico para aumentar la pureza de una fracción intermedia de IgG (por ejemplo, de la Fr-II+III) hasta $\geq 95\%$ de IgG, y preferentemente $\geq 97\%$ de IgG, antes de proceder al tratamiento de purificación de la patente.

La diafiltración de la etapa a) del procedimiento según la presente invención se realiza con el objetivo de que, para los componentes no deseados que provengan de un procedimiento de purificación estándar de IgG, se reduzca la concentración de los mismos por debajo de valores de concentración que puedan afectar al procedimiento según la presente invención. Por ejemplo, un componente no deseado es el etanol y mediante dicha etapa (a) de diafiltración, éste debe reducirse hasta una concentración menor de un 0,5% (peso/volumen), preferentemente menor de 0,1 %. Si están presentes otros reactivos de precipitación no desnaturalizados tales como PEG, ácido octanoico, detergentes no iónicos compatibles, o cualquier mezcla de ellos, la concentración de los mismos debe reducirse también hasta menos del 2% (peso/volumen) y en cualquier caso hasta que no provoquen más del 3% de polímero después de la etapa c).

Además, en esta etapa de diafiltración se puede llevar la solución de IgG de partida hasta una fuerza iónica cuya conductividad sea menor de 1 mS/cm, y ajustar el pH entre 4,0 y 5,5, preferentemente en ambos casos. La diafiltración se puede llevar a cabo con agua para inyección o, preferentemente, con una solución tampón de baja fuerza iónica, tal como una solución de ácido acético o acetato sódico ≤ 5 mM ajustada con álcali o ácido diluido a pH 4,0-5,0.

La etapa de diafiltración (a) se lleva a cabo preferentemente en modo de flujo tangencial a través de membranas de ultrafiltración, por ejemplo, de polietersulfona o equivalentes, empleando un valor de corte molecular de entre 10 kDa y 100 kDa. De forma beneficiosa en el procedimiento según la presente invención, la etapa de diafiltración (a) sirve además para concentrar las proteínas hasta una concentración no mayor de un 5% (peso/volumen), preferentemente entre un 2% y un 4% (peso/volumen).

Una vez obtenida la solución de la etapa (a), ésta se estabiliza por ejemplo mediante la adición de sorbitol como agente estabilizante hasta una concentración máxima del 50% (peso/peso), preferentemente entre 30% y 35% en peso. Además, el pH se ajusta entre 4,2 y 6,0, preferentemente entre pH 4,6 y 5,2, mediante la adición de ácido (por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido acético) o álcali (por ejemplo, hidróxido sódico) de una manera conocida en la técnica.

El tratamiento térmico o calentamiento de la solución de la etapa (c) del procedimiento según la presente invención es un procedimiento especial también conocido como pasteurización, y se lleva a cabo a una temperatura entre 55°C y 63°C, durante un tiempo entre 1 y 24 horas. Aunque se puede tratar térmicamente la solución a cualquier temperatura y tiempo dentro de los intervalos mencionados anteriormente, preferentemente el tratamiento térmico se lleva a cabo a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10-11 horas. En cualquier caso, no debe generarse más de un 3% de polímeros/agregados de alto peso molecular, y preferentemente entre el 1% y el 2%. Asimismo, la actividad proteolítica debida a la presencia eventual de factores procoagulantes, por ejemplo factor XI/XIa u otras proteasas, medida cromogénicamente para distintos sustratos (S-2302, S-2288, y S-2238) según se ha descrito en la técnica (ver ejemplo 3), se reduce, como mínimo, 5 veces con respecto a su contenido inicial.

Seguidamente, la solución se enfría, preferentemente entre 18°C-30°C, y se diluye preferentemente con, como mínimo, un 33% (en peso) de agua para inyección o más preferentemente con solución tampón que contiene una sal compatible (por ejemplo, sales sódicas de acetato, fosfato, citrato, o similares) a una concentración preferentemente ≤ 20 mM. La solución una vez diluida contiene una concentración de sorbitol $\geq 5\%$ en peso, y una concentración proteica ≥ 5 mg/ml. A esta solución se le añade una sal compatible totalmente ionizable, preferentemente cloruro

sódico, en sólido o en solución concentrada, por ejemplo 3 M (mol/litro), hasta obtener una solución de cloruro sódico con una concentración comprendida entre 0,20 M (mol/litro) y 0,50 M (mol/litro), preferentemente entre 0,25 M (mol/litro) y 0,40 M (mol/litro). Si es necesario, el pH se reajusta entre 4,2 y 5,5, y preferentemente entre 4,5 y 5,0, por adición de ácido clorhídrico o ácido acético y/o hidróxido sódico preferentemente diluidos.

La solución acondicionada de la manera descrita anteriormente, es decir, después de diluir, ajustar la concentración salina y el pH, que contiene como máximo un 5% de dímeros, se inyecta en una columna de cromatografía que contiene resinas de perfusión de intercambio catiónico fuerte, que tiene, como mínimo, uno de los grupos sulfónicos catiónicos (grupos sulfonilo, sulfónico, o sulfopropilo: S, HS, SP) unido covalentemente a una matriz sintética de perfusión insoluble y prácticamente incompresible compuesta por partículas rígidas de polimetacrilato o poliestireno, y preferentemente constituida por una matriz o soporte de partículas de entre 20-100 μm de poliestireno polivinilbenceno. La resina puede empaquetarse en una columna cilíndrica de flujo axial de diámetro apropiado para su empaquetamiento, ocupando preferentemente entre unos 5-20 cm de altura de resina, o bien empaquetarse en una columna de flujo radial de preferentemente entre 10-15 cm de recorrido. En ambos casos se utilizan, como mínimo, 1 litro, y preferentemente entre 1 y 10 litros de dicha resina por cada kg de IgG (seca) a purificar, lo que equivale a una carga de entre 100 y 1000 mg de IgG/ml de gel. Preferentemente, la cantidad de resina empaquetada en la columna utilizada es de entre 2 y 5 litros por kg de IgG (equivalente a una carga de 200-500 mg IgG/ml de gel). Antes de inyectar el producto se equilibra la columna con una solución tampón que contiene, preferentemente, acetato sódico aproximadamente entre 5 y 50 mM (milimolar), y más preferentemente 10 mM (milimol/litro), y una concentración de cloruro sódico (si es la sal de elección añadida al producto) aproximadamente igual o equivalente a la que contiene el producto. El caudal de inyección preferente no es superior a 50 volúmenes de columna/hora, y más preferentemente entre 5-30 volúmenes de columna/hora, siendo la temperatura preferente de 18°C-30°C. Los monómeros/dímeros de IgG pasan libremente a través de la columna, recuperándose en el efluente más del 90% del total de los monómeros más dímeros aplicados (la adsorción es < 10% de monómeros/dímeros), y preferentemente se obtiene una recuperación $\geq 93\%$, recuperándose dicho efluente en pool hasta un volumen apropiado. Simultáneamente, los agregados/polímeros son capturados por las resinas en una cantidad $\geq 85\%$ de su contenido inicial, lo cual equivale a una reducción de más de 5 veces, y preferentemente una reducción $\geq 95\%$ (≥ 20 veces) del contenido inicial del material procedente del tratamiento térmico, hallándose (no adsorbido) en el pool de efluente de columna $\leq 0,3\%$ de polímeros, y preferentemente $\leq 0,1\%$ ó $\leq 0,06\%$. Asimismo, aumentando adecuadamente la carga de la columna y aplicando un post-lavado, por ejemplo con, como mínimo, 2 volúmenes de columna con una solución igual o equivalente a la utilizada en el equilibrado de la columna, aún puede incrementarse, más preferentemente, la recuperación de monómeros/dímeros hasta $\geq 95\%$. De este modo se pueden alcanzar recuperaciones $\geq 95\%$ reinyectando la fracción de regeneración en la misma columna, convenientemente diluida y ajustada a las condiciones utilizadas en la carga inicial o de menor fuerza iónica. La inyección por gradiente decreciente, como ya se ha indicado, también favorece la recuperación de los monómeros/dímeros de IgG y fácilmente un experto puede alcanzar una recuperación de producto $\geq 95\%$ de esta manera o con un proceso similar. Para ello, se inicia la carga a la concentración salina máxima según el pH, para minimizar fenómenos de sobreadsorción en los primeros volúmenes aplicados, aumentando progresivamente la capacidad de la resina al ir disminuyendo la fuerza iónica hasta finalizar el volumen de carga. Por ejemplo, puede emplearse, preferentemente, un gradiente decreciente de hasta el 15% entre la concentración salina del producto seleccionada al inicio de la carga con respecto al final de la misma.

Opcionalmente, el procedimiento según la presente invención puede comprender uno o más tratamientos de inactivación/eliminación vírica complementarios al tratamiento térmico de la solución. Entre los tratamientos de inactivación vírica que se pueden emplear en el procedimiento según la presente invención se encuentran la incubación a pH ácido (por ejemplo, pH 3,8-4,2 a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 4-24 horas, en presencia o ausencia de pepsina, o de detergentes no iónicos como Pluronic, Triton, Tween, y similares); el tratamiento con un disolvente orgánico alquil-fosfato (tri-n-butil fosfato o TNBP al 0,3%); detergentes (Triton X-100 o Triton X-45 al 1%) (Neurath y otros. Patente US-514375), preferentemente ajustando la solución de IgG a pH 4,2-6,0 y la temperatura a 4-30°C, incubándose durante 1-12 horas, y más preferentemente unas 6 horas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$; y la nanofiltración por membrana de retención vírica (celulosa regenerada, polietersulfona, fluoruro de polivinilideno), sea por medio de flujo tangencial o terminal, en forma de cassette o sándwich (superficie plana), cartucho (pliegues, láminas, discos) o fibra hueca, preferentemente a través de tamaño de poro ≤ 50 nm, aproximadamente entre 10-50 nm, y preferentemente entre unos 15-35 nm y más preferentemente de 20 ± 2 nm de poro, con nanofiltración terminal. Dichas etapas de inactivación/eliminación pueden llevarse a cabo antes o después de la etapa de tratamiento térmico, con excepción de cuando se utiliza la nanofiltración, que es preferente aplicarla antes del tratamiento térmico.

Una vez finalizada la etapa (d) del procedimiento según la presente invención, la solución obtenida se diafiltra con agua para inyección o preferentemente con una solución tampón de baja fuerza iónica, que puede contener por ejemplo ácido acético ≤ 5 mM a pH 4,0-5,5, y opcionalmente estabilizantes o excipientes para la formulación final. La diafiltración final se lleva a cabo por flujo tangencial a través de membranas de ultrafiltración de polietersulfona o equivalente, empleando un valor de corte molecular preferentemente de entre 10 kDa y 100 kDa, y más preferentemente entre 30 kDa y 50 kDa. Después de un número apropiado de volúmenes de diafiltración para reducir la concentración salina, preferentemente hasta una conductividad ≤ 2 mS/cm, se concentra la proteína preferentemente a las concentraciones nominales del 5%, 10%, 16% ó 20%, o cualquier otra concentración intermedia entre aproximadamente 5% y 22% (p/v). La solución se estabiliza preferentemente por adición de un

polialcohol (poliol) o aminoácidos. En cualquier caso, la osmolalidad de la solución resultante será ≥ 240 mOsm/kg, y aproximadamente isotónica. Preferentemente, se ajusta el pH a $5,2 \pm 0,6$ y se comprueba que se halla entre 4,6 y 5,8, reajustándose con ácido o álcali diluidos si fuese necesario.

La solución ajustada se filtra estérilmente por membrana absoluta de unas 0,2 μm de tamaño de poro de una forma conocida en la técnica. La solución líquida obtenida se dosifica asepticamente en contenedores apropiados, y se somete a una incubación (cuarentena) de no menos de 14 días a $25 \pm 5^\circ\text{C}$, preferentemente, a fin de observar cualquier signo de inestabilidad o contaminación en cada unidad individual dosificada. El producto envasado es almacenado a las mismas condiciones que en la cuarentena (temperatura ambiente de $25 \pm 5^\circ\text{C}$) o en cámara fría ($5 \pm 3^\circ\text{C}$). El producto obtenido mediante el procedimiento según la presente invención se mantiene estable (esencialmente inalterable) durante, como mínimo, 1 año a una temperatura entre $2-30^\circ\text{C}$ sin mostrar señales relevantes de degradación, tanto en sus características físicas (aspecto, color, turbidez, sedimentos, partículas o fibras) como en parámetros analíticos de especificaciones, según Farmacopea Europea por ejemplo (agregados de alto peso molecular, fragmentos, actividad anticomplementaria o ACA, activador de precalicreína o PKA, subclases de IgG, etc.).

La presente invención se describe a continuación con más detalles en referencia a los ejemplos. Estos ejemplos, sin embargo, no están destinados a limitar el alcance técnico de la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1.

A partir de una mezcla de plasma humano congelado apto para fraccionamiento, se procedió a su crioprecipitación a una temperatura comprendida entre 0 y 4°C . El crioprecipitado se separó por centrifugación en flujo continuo (centrífuga Westfalia) a la misma temperatura de crioprecipitación. El sobrenadante se procesó de acuerdo al método 6 de fraccionamiento de Cohn (Cohn y otros, supra) con etanol en frío hasta la obtención de la Fr-II+III. La pasta obtenida o precipitada (Fr-II+III) se separó por filtración prensa y se congeló a $\leq 20^\circ\text{C}$. Posteriormente, la Fr-II+III se procesó por el método 9 de fraccionamiento de Cohn-Oncley (Oncley, J. y otros, supra) hasta la obtención de la Fr-II. La Fr-II obtenida se almacenó a $\leq 20^\circ\text{C}$.

La Fr-II se suspendió con una solución isotónica de glicina y cloruro sódico y se ajustó a pH aproximadamente neutro. La solución se trató con adsorbentes inorgánicos, separándose por centrifugación (centrífuga RINA) y luego se clarificó en un filtro con una profundidad de $\leq 0,5$ μm de poro.

El filtrado se ajustó a pH entre 5,5 y 6,0 con HCl 0,5 M y se ultrafiltró a través de membranas de polisulfona de 10 kDa de valor de corte molecular nominal. En primer lugar se redujo el volumen y luego se inició la diafiltración a volumen constante frente a agua para inyección a $2-8^\circ\text{C}$. Finalizada la misma, se post-lavó el equipo de ultrafiltración y se llevó la solución hasta una densidad óptica (a 280 nm) de 60 ± 5 UA de proteína. Se añadió sorbitol sólido a razón de 0,5 kg por cada kg de la solución presente y después de disolverlo se ajustó el pH de la solución a $5,5 \pm 0,5$ con HCl 0,5 M.

A continuación, se procedió a realizar el tratamiento térmico de la solución en un recipiente termostatzado recirculando el fluido calefactor por la camisa, de forma que el producto se llevó a entre $60-61^\circ\text{C}$ y se mantuvo así durante 10-11 horas. A continuación se enfrió la solución hasta $2-8^\circ\text{C}$.

Los resultados obtenidos del promedio de 3 lotes distintos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

ETAPA DE PROCESO	PROTEÍNA TOTAL (%) (D.O. 280 nm)	PUREZA (% IgG electrofor.)	POLÍMEROS (%)	ETANOL (% v/v)	CONDUCT. (mS/cm)
Suspensión Fr-II	6	≥ 97	$\sim 0,2$	3,3 (3,2-3,4)	~ 10
Solución ultrafiltrada	4	≥ 97	0,21 (0,19-0,23)	$\leq 0,1$	$\leq 0,5$
Solución calentada (10 h a $60-61^\circ\text{C}$)	3	≥ 97	1,58 (1,30-1,86)	$\geq 0,1$	$\geq 0,5$

Los resultados anteriores muestran el efecto de la purificación previa de la Fr-II+III (suspensión FrII $\geq 97\%$ por electroforesis) y de la reducción de agentes desnaturizantes (etanol) en la agregación durante el tratamiento térmico con solo un 1,58% de polímeros, lo que posibilita su posterior adsorción por resinas sintéticas catiónicas.

Ejemplo 2

Partiendo de un pool de plasma humano, se procesó igual que como se ha descrito en el ejemplo 1 hasta obtener Fr-II+III (prueba a) y se continuó hasta Fr-II (prueba b). Con el fin de determinar el efecto de la purificación, así como de la presencia de agentes desnaturalizantes sobre la polimerización durante el tratamiento térmico, se procedió de la siguiente forma:

a) La Fr-II+III se suspendió en agua para inyección a 2-8°C con una proporción de 1:3,5 en peso, y después de obtener una suspensión homogénea se llevó a pH $5,25 \pm 0,25$ con HCl 0,5 M. Posteriormente se centrifugó en una decantadora (fuerza centrífuga entre 200 g–1000 g) obteniendo una suspensión clarificada.

b) La Fr-II se procesó como en el ejemplo 1 hasta obtener una solución clarificada por filtro de profundidad.

Cada una de las anteriores soluciones se estabilizó por adición de sorbitol sólido a razón de 0,5 kg por kg del sobrenadante de partida. Después de disolverse el sorbitol, el pH se ajustó a $5,5 \pm 0,5$, si fue necesario. Cada solución se calentó a 60-61°C durante 10-11 horas. Posteriormente se enfrió a 2-8°C.

Los resultados obtenidos del producto pasteurizado de las pruebas a) y b), con respecto al ejemplo 1, se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

PRUEBA O PROCESO	PROTEÍNA TOTAL (%) (D.O. 280 nm)	PUREZA IgG (%)	POLÍMEROS (%)	ETANOL (% v/v)	CONDUCT. (mS/cm)
Prueba a)	4	75	15	2,5	2
Prueba b)	4	≥ 97	5,03	2,5	$\leq 0,5$
Proceso Ejemplo 1	4	≥ 97	1,58	$\leq 0,1$	$\leq 0,5$

Los resultados de las pruebas a) y b) ponen de manifiesto el efecto de la pureza de la IgG de partida y la necesidad de alcanzar valores $\geq 97\%$. Por otro lado, comparando la prueba b) con el proceso del Ejemplo 1 resulta evidente el efecto del etanol residual procedente del fraccionamiento etanólico y la necesidad de su eliminación. Se deduce por tanto que solo serían aceptables las condiciones del ejemplo 1 para el procedimiento de la invención.

Ejemplo 3

Se fraccionó el plasma de igual forma que en el ejemplo 1 hasta la Fr-II+III, y este material se purificó con PEG o resinas de intercambio aniónico hasta obtener un producto suficientemente puro.

Para esta purificación inicial de la Fr-II+III se aplicaron las mismas condiciones de proceso que se describen en la descripción de la patente EP 1225180. Más detalladamente, en este ejemplo se suspendió la Fr-II+III en una solución acuosa que contenía sorbitol, fosfato disódico y ácido acético hasta disolver eficazmente toda la IgG. Se precipitaron las principales proteínas acompañantes por adición de PEG hasta el 4%. Después, se añadieron adsorbentes inorgánicos y coadyuvante de filtración. Antes de separar el precipitado por filtración prensa (placas de celulosa prensada), se reajustó el pH a $5,0 \pm 0,5$. Se separó la pasta y se recogió el pool del filtrado. Se inyectó en una columna de cromatografía que contenía resinas de intercambio aniónico tipo DEAE-Sepharose® (Amersham Biosciences, Suecia), previo ajuste de pH y filtración clarificante por gradiente hasta $\leq 0,5 \mu\text{m}$, justo antes de la entrada en la columna. Se recogió todo el efluente obtenido durante la carga del producto que contenía la IgG purificada. El anterior efluente se ajustó a pH $4,4 \pm 0,2$ con HCl 0,5 M y se ultrafiltró a través de membranas de polisulfona de 100 kDa de valor de corte molecular nominal. En primer lugar, se redujo el volumen unas 4 veces hasta llevar a una concentración de un 2% de proteína y luego se inició la diafiltración a volumen constante frente a 4 volúmenes de agua para inyección con ácido acético 4 mM (milimol/litro) y sorbitol al 5% ajustado a pH $4,2 \pm 0,2$ con NaOH 0,5 M, y a 2-8°C. Finalizada la misma, se post-lavó el equipo de ultrafiltración llevándose la solución hasta una densidad óptica (a 280 nm) de 55 ± 5 UA de proteína. Posteriormente se añadió HCl 0,5 M hasta pH $4,0 \pm 0,1$ procediendo a una incubación de 4 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Seguidamente se añadió sorbitol sólido a razón de 0,43 kg por cada kg de la solución presente (33% peso/peso), y después de disolverlo se ajustó el pH de la solución a $4,9 \pm 0,1$ con NaOH 0,5 M.

Se procedió al tratamiento térmico en un recipiente termostatzado recirculando fluido calefactor por la camisa, de forma que el producto se llevó a entre 60-61°C y se mantuvo así durante 10-11 horas. A continuación se enfrió la solución hasta 2-8°C. Los resultados analíticos de composición para efectuar el seguimiento del proceso se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

ETAPA DE PROCESO	PROTEÍNA TOTAL (%)	PUREZA IgG (%)	POLÍMEROS (%)	ETANOL (% v/v)	PEG (%)	CONDUCTIVIDAD (mS/cm)
Suspensión Fr-II+III	n.d.	70	12	1	0	1,5
Solución purificada efluente columna	n.d.	≥ 98	≤ 0,06	0,8	4	1,2
Solución ultrafiltrada	4,0	≥ 98	≤ 0,06	≤ 0,1	0,8	≤ 0,5
Solución calentada (10 h a 60°C)	2,8	98	1,5	≤ 0,1	0,5	≤ 0,5
n.d.: no determinado						

Los resultados de la tabla 3 reflejan que un contenido de PEG residual del 0,8% no afecta al grado de polimerización durante el tratamiento térmico (1,5% de polímeros). De la misma forma, dicha polimerización no se ve afectada por el método de purificación previamente utilizado, sea sólo con etanol o con etanol + PEG + cromatografía aniónica (ver ejemplos 1 y 2), con la condición de que la pureza conseguida sea del mismo orden (≥ 97% de IgG).

Asimismo, con otros lotes a escala preparativa procesados de la misma forma descrita anteriormente en este ejemplo 3, se llevaron a cabo determinaciones analíticas con distintos sustratos cromogénicos para evaluar las etapas con capacidad de inactivación de enzimas proteolíticos, principalmente procoagulantes. Se utilizaron los sustratos S-2302, S-2288 y S-2238 (específicos de factores de coagulación del complejo protrombínico, trombina, plasminógeno/plasmina, FXI/FXIa, FXII, PKA, etc.), en base a la técnica descrita según el estado de la técnica, calculándose la pendiente de la cinética de la reacción cromogénica en unidades de absorción de densidad óptica (D.O.) por minuto (min) en relación a la concentración proteica aplicada (g/ml). La relación (D.O./min)/(g/ml) de las etapas previas y posteriores a la pasteurización se muestra en la tabla 4.

Tabla 4

ETAPA DE PROCESO	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (D.O./min)/(g/ml)		
	S-2302	S-2208	S-2238
Solución purificada efluente columna	1,69	2,03	0,23
Solución ultrafiltrada	0,87	1,1	0,14
Solución calentada (10 h a 60°C)	0,12	0,14	0,017

De los resultados de la tabla 4 se observa que en las condiciones específicas del proceso de pasteurización se consigue reducir la actividad proteolítica (factores procoagulantes principalmente) más de 5 veces con respecto al contenido inicial (solución ultrafiltrada) según valores obtenidos con los tres distintos sustratos cromogénicos utilizados.

Ejemplo 4

Se dispuso de 3 lotes de producción distintos procesados de la misma forma que en el ejemplo 3 hasta obtener una solución pasteurizada de cada uno de ellos. Cada solución se diluyó unas 4 veces con solución de acetato sódico 10 mM (milimol/litro) a unos 20-25°C para alcanzar unas 10 UA de densidad óptica (a 280 nm) y una concentración de sorbitol de aproximadamente el 8% en peso, añadiendo la cantidad de NaCl necesaria para llevar el producto a la concentración final de 0,4 M (mol/litro). La solución se ajustó a pH 4,5 por adición de HCl diluido (0,1 M-0,5 M).

La solución se inyectó en una columna cromatográfica catiónica fuerte de poliestireno (POROS HS® 50 µm, Applied Biosystems, Estados Unidos), de unos 8 ml de volumen (10 cm altura x 0,8 cm² de sección transversal). La columna se equilibró con unos 10 volúmenes de columna de una solución tampón 10 mM de acetato sódico a un pH y a una concentración de NaCl iguales al producto que se carga. Se inyectó el producto a un caudal de unos 20 volúmenes de columna/hora procediéndose a recoger todo el efluente de columna desde el inicio de la inyección. Se tomó muestra del efluente a un volumen fijo de 16 volúmenes de columna correspondientes a una carga de unos 115 mg de IgG/ml de gel, determinándose la proteína por D.O. (280 nm) y el contenido de polímeros por HPLC, para el cálculo del % de recuperación de IgG (monómeros/dímeros) y el % de reducción de polímeros conseguido. En la

Tabla 5

PROCESO	D.O. (280 nm) SOL. DILUIDA (UA)	RECUPERACIÓN PROTEÍNA (%)	POLÍMEROS INICIAL (%)	POLÍMEROS FINAL (%)	REDUCCIÓN DE POLÍMEROS (%)
Lote A	10	n.d.	1,90	0,11	94
Lote B	10	n.d.	1,82	0,09	95
Lote C	10	96	2,51	0,15	94
n.d.: no determinado					

De acuerdo con los anteriores resultados se obtiene una reducción muy relevante y consistente del contenido de polímeros, de entre el 94%-95%, y para un contenido de polímero inicial comprendido entre 1,8% y 2,5%, se ha obtenido un contenido final entre 0,09-0,15. Por otro lado, es de remarcar la recuperación de IgG (monomérica/dimérica) que es del 96%, así como una capacidad de carga que supera los 100 mg IgG/ml gel y que el tiempo de proceso fue inferior a 2 horas (equilibrado y carga).

Ejemplo 5

El procedimiento utilizado fue igual al ejemplo 4 pero se investigó la capacidad de carga a distintos volúmenes de inyección en las condiciones establecidas en el ejemplo 4. Se tomaron muestras del efluente a distintos volúmenes aplicados determinándose la proteína por D.O. (280 nm) y el contenido de polímeros por HPLC para el cálculo del % de recuperación de IgG (monómeros/dímeros) y el % de reducción de polímeros conseguido a los diferentes valores de carga (mg de IgG/ml de gel). Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6

VOL. COLUMNA (VC) APLICADO	CARGA INYECTADA (mg IgG/ml gel)	POLÍMEROS (EFLUENTE) (%)	REDUCCIÓN POLÍMEROS(%)	RECUPERACIÓN PROTEÍNA (IgG) (%)
Solución inicial de Carga	0	2,51	0	100
2	14	≤0,06	≥98	87
16	115	0,15	94	95
32	230	0,19	92	95
50	360	0,25	90	97

Los resultados muestran, de forma muy relevante, que pueden alcanzarse valores de carga de 360 mg de IgG/ml de gel, en condiciones normales de flujo de hasta 20 volúmenes de columna por hora, con máxima recuperación de

IgG, manteniendo de forma sostenida la capacidad para reducir los polímeros por debajo del límite del 0,3% hasta los 50 volúmenes de columna aplicados. El tiempo de proceso hasta la carga explorada no supera las 3 horas.

Ejemplo 6

- 5 Con el fin de conocer el intervalo operativo de concentración de NaCl a un pH establecido de 4,5 y optimizar la eliminación de polímeros maximizando la recuperación de IgG, se procedió como en el ejemplo 4, pero estudiando distintas concentraciones de NaCl entre 0,35 y 0,425 M muestreándose el efluente de columna a 2 VC, 25 VC y 50 VC, para determinar la proteína por D.O. (280 nm) y los polímeros por HPLC, calcular los % de recuperación de proteína y de reducción de polímeros. En la tabla 7 se reflejan los resultados obtenidos.

10

Tabla 7

VOL. COLUMNA (VC) APLICADO	CARGA INYECTADA (mg IgG/ml gel)	POLÍMERO EFLUENTE A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE NaCl (%)			
		0,425 M	0,40 M	0,375 M (n = 2)	0,35 M
Solución inicial de Carga	0	1,88	2,12	2,13-2,14	1,99
2	14	0,10	n.d.	≤0,06	≤0,06
25	180	0,27	0,11	≤0,06	≤0,06
50	360	0,33	0,31	≤0,06	≤0,06
Pool efluente de carga a 50 VC	360	n.d.	n.d.	≤0,06	≤0,06
n.d.: no determinado					

- 15 En la tabla 8 se muestran los resultados de la recuperación de IgG y la reducción de polímeros del efluente al valor final aplicado de carga máxima (50 VC).

Tabla 8

CONCENTRACIÓN NaCl (M) a pH 4,5	RECUPERACIÓN IgG (%)	REDUCCIÓN POLÍMEROS (%)
0,425	95,2	n.d.
0,40	93,0	n.d.
0,375 (n=2)	94,2 – 93,2	≥97
0,35	90,8	≥97
n.d.: no determinado		

20

Los anteriores resultados demuestran que en las mejores condiciones de concentración de NaCl la reducción de polímero no se ve mermada con el aumento de la carga aplicada hasta 50 VC (ó 360 mg IgG/ml gel). Asimismo, puede comprobarse que el intervalo de 0,40 M hasta 0,35 M de NaCl se puede utilizar para obtener una capacidad de carga máxima con un mínimo contenido de polímero (del ≤0,06%-0,31%) y una recuperación de IgG (monómero/dímero) de entre el 90,8% y el 94,2%.

25

Los mejores resultados se obtienen a un pH de 4,5, una concentración de NaCl de 0,375 M, siendo la concentración de 10 UA por D.O. (280 nm) y el caudal de inyección de 20 VC/h. Se comprueba que el polímero residual es ≤0,06%

(duplicado de la prueba) a 50 VC (360 mg IgG/ml gel) con una recuperación de IgG del 93,2%-94,2%. El tiempo de proceso no excede de 3 horas.

Ejemplo 7

Con el fin de conocer el intervalo de pH en el que se puede utilizar una concentración estable de NaCl de 0,35 M, y de optimizar la eliminación de polímeros minimizando la recuperación de IgG, se procedió como en el ejemplo 4, estudiando un intervalo de pH entre 4,5 y 5,0, y se tomaron muestras del efluente de columna al final de 2 VC, 21-25 VC y 50 VC, para determinar la proteína por D.O. (280 nm) y los polímeros por HPLC, y calcular los % de recuperación de proteína y de reducción de polímeros. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9

VOL. COLUMNA (VC) USADO	CARGA INYECTADA (mg IgG/ml gel)	POLÍMERO (%) EFLUENTE A DIFERENTES VALORES DE pH			
		pH 4,96	pH 4,88	pH 4,76	pH 4,50
Solución inicial de carga	0	2,25	1,72	1,95	1,99
2	14	0,45	0,20	0,17	≤0,06
21-25	151-180	1,06	0,59	0,24	≤0,06
50	360	1,25	0,66	n.d.	≤0,06
efluente total de carga hasta 50 VC	360	1,13	0,63	n.d.	≤0,06
n.d.: no determinado					

En la tabla 10 se muestran los resultados del cálculo de recuperación de IgG y reducción de polímeros del efluente al valor final aplicado de carga máxima (50 VC), y la reducción de polímero del efluente a mitad de la carga máxima (aprox. 25 VC).

Tabla 10

pH	RECUPERACIÓN IgG (50 VC) (%)	REDUCCIÓN POLÍMEROS (50 VC) (%)	REDUCCIÓN POLÍMEROS (25 VC) (%)
4,96	96,8	49,8	52,9
4,88	96,6	63,3	65,7
4,76	94,3 (*)	n.d.	87,7
4,50	90,8	≥97	≥97
(*)Determinado en el efluente a 21 VC; n.d.: no determinado.			

Los anteriores resultados ponen de manifiesto la fuerte dependencia entre pH y concentración de NaCl para una reducción eficaz de polímero con las mínimas pérdidas de IgG. A una concentración de 0,35 M de NaCl, se determinó que el pH más adecuado dentro del intervalo ensayado está comprendido aproximadamente entre 4,76 y 4,50, de forma que el polímero residual era entre ≤0,06%-0,24% (aplicando 21-50 VC) y la recuperación de IgG entre 90,8%-94,3%. El tiempo de proceso estuvo entre 2-4 horas.

Ejemplo 8

Se procedió igual que en el ejemplo 6, pero se estableció un pH entre 4,85 y 4,88 para estudiar las mejores condiciones de concentración de NaCl entre 0,1 M y 0,4 M. Los resultados se muestran en la tabla 11.

5

Tabla 11

VOL. COLUMNA (VC)	CARGA INYECTADA (mg IgG/ml gel)	EFLUENTE A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE NaCl						
		0,4 M (n=2)	0,375 M	0,35 M	0,325 M	0,3 M (n=3)	0,275 M	0,1 M
Solución inicial de carga	0	1,55 2,19	1,71	1,72	1,28	1,94 1,33 1,57	2,11	1,51
2	14	0,52 0,56	0,25	0,20	0,06	≤0,06 ≤0,06 ≤0,06	≤0,06	≤0,06
25	180	0,98 1,18	0,84	0,59	0,25	0,10 0,13 0,12	≤0,06	≤0,06
50	360	1,23 1,34	0,94	0,66	0,25	0,13 0,16 0,15	≤0,06	≤0,06
Efluente de carga a 50 VC	360	n.d.	0,87	0,63	0,17	≤0,06 n.d. 0,13	≤0,06	≤0,06
n.d.: no determinado								

En la tabla 12 se muestran los resultados del cálculo de recuperación de IgG y reducción de polímeros del efluente al valor final aplicado de carga máxima (50 VC).

10

Tabla 12

CONCENTRACIÓN NaCl (mol/litro) a pH 4,85-4,88	(%) RECUPERACIÓN IgG	(%) REDUCCIÓN POLÍMEROS
0,4 M	95-97	n.d.
0,375 M	96,3	49,1
0,35 M	96,6	63,4
0,325 M	94,9	86,7
0,3 M	93,7 93,6 93,7	≥97 n.d. 91,7
0,1 M	76,0	≥96
n.d.: no determinado		

15

Los anteriores resultados demuestran la viabilidad del proceso a pH 4,85-4,88 dentro del intervalo de 0,325 M hasta 0,275 M de NaCl para una capacidad de carga máxima (50 VC, ó 360 mg IgG/ml gel), con un mínimo contenido de polímero residual (del ≤0,06%-0,17%) y una recuperación de IgG (monómero/dímero) de entre el 92,5% y el 94,9%. Los mejores resultados se obtienen a una concentración de NaCl de 0,3 M en la que se obtiene una recuperación del 93,7% y un polímero residual máximo del 0,13% en el efluente. A la concentración inferior de NaCl de 0,1 M se reducen totalmente los polímeros pero la recuperación de IgG es inferior al 90%.

20

Comparando los resultados de este ejemplo 8 con respecto a los del ejemplo 6 se pone en evidencia la fuerte dependencia entre el pH y la concentración de NaCl, cuyos parámetros deben ajustarse dentro de un intervalo adecuado para conseguir los valores óptimos de reducción de polímeros y recuperación de IgG. Los anteriores ejemplos demuestran que entre pH 4,5 y pH 4,9 y una concentración de NaCl de 0,275 M a 0,4 M, se obtienen los resultados deseados en cuanto a polímero residual $\leq 0,3\%$ y reducción $\geq 85\%$, y recuperación de IgG (monómeros/dímeros) $\geq 90\%$.

Ejemplo 9

El objeto de este ensayo era valorar la capacidad de carga de las resinas POROS HS® (Applied Biosystems, Estados Unidos) al aplicar un proceso cromatográfico convencional, el cual implica la adsorción de toda la IgG para su posterior elución, y comparar con los resultados obtenidos en las anteriores realizaciones de la presente invención. El proceso cromatográfico convencional se realizó a unas condiciones para la adsorción total de la IgG hasta saturación de las resinas y a distintos caudales de inyección.

A partir de un lote de producción procesado de la misma forma que en el ejemplo 3 hasta obtener una solución pasteurizada, se diluyó la solución con unas 4 veces de solución de acetato sódico 10 mM (milimol/litro) a unos 20-25°C para llevar a unas 10 UA de densidad óptica (a 280 nm) con aproximadamente el 8% (p/p) de sorbitol. La solución se ajustó a pH 4,5 por adición de HCl diluido (0,1 M-0,5 M).

Se inyectó en una columna cromatográfica catiónica fuerte de resina sintética de poliestireno (POROS HS® 50 μm , Applied Biosystems, Estados Unidos), de unos 4 ml de volumen (4 cm altura x 1 cm^2 de sección transversal). La columna se equilibró con unos 10 volúmenes de columna de una solución tampón 10 mM de acetato sódico a un pH de 4,5. Se inyectó el producto a distintos caudales de carga de entre 5 y 20 volúmenes de columna/hora. Se tomó muestra del efluente de columna desde el inicio de inyección a distintos volúmenes de columna determinándose la proteína por D.O. (280 nm) con el fin de calcular la capacidad de carga máxima en condiciones dinámicas de flujo a un valor de proteína aproximado del 5% de la solución inyectada. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13.

Tabla 13

CAUDAL DE INYECCIÓN (VC/hora)	CAPACIDAD DE CARGA (mg de IgG/ml de gel)
5	63
10	58
20	55

De los resultados se deduce que la capacidad máxima de las resinas utilizadas para la adsorción total de la IgG, en las mejores condiciones dinámicas de flujo en un proceso cromatográfico convencional, se halla alrededor de los 60 mg IgG por ml de resina, y se mantiene prácticamente inalterable dentro de los caudales estudiados de inyección de 5-20 VC/h. Dado que este resultado está muy alejado (unas 6 veces inferior) de los > 360 mg IgG/ml de gel obtenido en los ejemplos 6 y 8 aplicando las condiciones del procedimiento según la presente invención, se demuestra que el procedimiento según la presente invención es muy superior en cuanto a productividad en relación con la cromatografía convencional descrita en la técnica anterior.

Ejemplo 10

En este ejemplo se diseñó el ensayo con la finalidad de determinar la resolución cromatográfica (separación de polímero) y la recuperación de IgG en unas condiciones de ciclo cromatográfico completo (carga, lavado y elución) con adsorción total de la IgG (cromatografía convencional), y para comparar los resultados obtenidos con los ejemplos anteriores del proceso según la presente invención.

Se procedió de igual forma que en el ejemplo 9, pero se inyectó en la columna una cantidad de solución de IgG de partida equivalente a un 80% de su capacidad máxima (unos 50 mg IgG/ml de gel) a un caudal de unos 5 VC/h. Después de la carga de todo el producto se procedió a un post-lavado con unos 8 VC de una solución tampón igual a la solución de equilibrio inicial que comprende acetato sódico 10 mM a pH 4,5. Seguidamente se procedió a la elución de la IgG aplicando un gradiente de concentración de NaCl desde 0 hasta 1 M (mol/litro) conteniendo glicina 0,5 M a pH 4,5, en unos 25 VC en total. La IgG eluida se recogió en fracciones para su posterior análisis de proteína (D.O. 280 nm) y distribución molecular (HPLC). Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14

FRACCIÓN	VOLUMEN (VC)	POLÍMEROS (%)	RECUPERACIÓN TOTAL IgG (%)
SOLUCIÓN APLICADA	14	2	100
EFLUENTE CARGA + POST-LAVADO	22	n.d.	n.d.
1ª FRACCIÓN FLUIDO	16	≤0,06	64
2ª FRACCIÓN FLUIDO(COLA)	2,5	19	6
2º PICO	4	57	16
REGENERACIÓN	5	50	4
n.d.: no determinado			

De acuerdo con los anteriores resultados se demuestra que para una carga de 50 mg IgG/ml gel se obtiene una recuperación máxima del 64% de IgG (monómero/dímero) para un contenido ≤ 0,06% de polímero, hallándose en la fracción de cola y en el 2º pico de elución la mayor parte de la IgG mezclada con el polímero que no es recuperable. Este valor de recuperación no es comparable a los obtenidos en los ejemplos anteriores en los que se aplica el procedimiento según la presente invención, en los que se demuestra una satisfactoria eliminación de polímero y una recuperación de más del 90% de IgG.

Ejemplo 11

Se diseñó una prueba adicional para estudiar los límites de pH y fuerza iónica (NaCl) posibles a utilizar y conocer el efecto de la concentración de IgG en la carga.

Se realizaron varias pruebas con IgG pasteurizada procedente de distintos lotes de producción procesados igual que en el ejemplo 3. No obstante, en una de las pruebas se diluyó 4 veces (hasta D.O. 280nm = 10 UA) y las restantes entre 1,5-2 veces (hasta D.O. 280nm = 20 - 23 UA), aproximadamente, con solución de acetato sódico 10 mM, y a cada una de las cuales se le añadió el NaCl necesario para llevar a la concentración final deseada entre 0,275 M y 0,45 M, ajustándose a un pH final de 4,2 y 5,5, respectivamente. Dichos ajustes de pH se efectuaron con ácido acético diluido. Las soluciones ajustadas se inyectaron en ciclos independientes en una columna POROS® HS 50 (Applied Biosystems, Estados Unidos), tal y como se describe en el ejemplo 4, pero en este caso aplicando entre aproximadamente 150 y 750 mg de IgG / ml de gel en los ensayos realizados.

Se determinó el contenido de polímero y dímero (%) mediante HPLC y la recuperación de IgG (%) a distintos valores de carga. Los valores obtenidos se reflejan en la tabla 15.

pH	[NaCl] (M)	D.O.280 Inicial	Uso (VC)	Carga (mg IgG / ml gel)	Inicial		Pol. Final (%)	Recup. IgG (%)	Reducción Polímero (%)
					Pol. (%)	Dim. (%)			
4,2	0,45	10	32	230	2,45	< 1	≤0,06	91,0	≥98
5,0	0,275	23	20	330	2,61	N.D.	≤0,06	n.d.	≥98
			35	580			0,07	92,6	97
4,85	0,275	20,6	10	147	1,76	2,5	≤0,06	92,5	≥96
			25	369			≤0,06	99,5	≥96
			40	590			0,12	97,2	93
			50	737			0,61	96,0	65
5,5	0,20	22,4	2	32	2,76	4,5	≤0,06	80,1	≥98
			25	403			0,38	96,9	86
			50	806			1,34	94,5	51
N.D.: no detectado									
n.d.: no determinado									

A partir de distintos lotes pasteurizados con un contenido de polímero inicial equivalente e inferior al 3% se demuestra que en cualquier valor de ajuste dentro de los límites explorados en este ejemplo (pH 4,2-5,5 y NaCl 0,20-0,45 M) es posible adsorber selectivamente los polímeros hasta valores entre ≤0,06%-0,12%, equivalente a reducciones entre el 93% y ≥98%, y recuperaciones de IgG superiores al 80% (91,0-99,5% alcanzados entre pH 4,2

y 5,0). Asimismo, es de destacar que la capacidad de carga y la eficiencia de la columna no se ven mermadas al incrementar la concentración proteica de la solución de producto hasta un valor de D.O. 280 nm de 23 UA equivalente a 14,7-16,5 mg de IgG/ml, habiéndose alcanzado cargas de 580-590 mg IgG/ml de gel. Sin embargo, en el extremo superior del intervalo de pH (pH 5,5) debe reducirse sensiblemente la concentración salina (de 0,45 M hasta 0,2 M) para conseguir una reducción relevante de polímero. Asimismo, se observa una menor capacidad de carga que a valores de pH inferiores, pues con una aplicación de 403 mg IgG/ml gel se cuantifica un mayor contenido de polímero, siendo la reducción del mismo de solo el 86%. Este efecto puede atribuirse a la presencia de una mayor cantidad de moléculas dimericas presentes a pH 5,5 con respecto a pH 4,2, y cuya proporción aumenta con el pH.

Ejemplo 12

De los anteriores ejemplos 6, 8 y 11, se determinó para la resina de perfusión de poliestireno POROS®-HS 50 una fórmula empírica (1) a partir de la cual puede establecerse con más exactitud la concentración de NaCl necesaria para obtener los resultados esperados de polímero final y recuperación, en función del pH utilizado. La expresión: (1) $[NaCl] = 0,24 + (5,2 - pH)/5 = 1,28 = 0,2 \times pH$ proporciona aproximadamente los valores esperados dentro del intervalo de pH establecido (pH 4,2-5,5) para la resina estudiada. A partir de los datos de los ejemplos, para un polímero final preferentemente $\leq 0,1\%$ y recuperación no inferior al 90%, las concentraciones de NaCl necesarias a distintos pH (valor observado y valor calculado según fórmula) se muestran en la tabla 16.

Tabla 16

pH	Valor observado (M)	Valor calculado (M)
4,20	0,45	0,44
4,50	0,375	0,38
4,85-4,88	0,300-0,275	0,31
4,96	0,275	0,29
5,20	n.d.	0,24
5,50	0,20	0,18

Los resultados de la tabla 16 muestran una buena correlación lineal entre los valores observados y los calculados según la fórmula, incluso en los valores extremos de pH.

Ejemplo 13

Se procesó el plasma de igual forma que en el ejemplo 1 para obtener una solución de IgG polivalente purificada (pureza $\geq 97\%$ de IgG) por fraccionamiento etanólico (según método de Cohn-Oncley). La Fr-II obtenida se diafiltró por membranas de 10 kDa hasta 60 UA y posteriormente se pasteurizó (10-11 h a 60-61°C) en presencia de D-sorbitol al 33% (peso/peso) y pH $5,5 \pm 0,5$. La solución pasteurizada se diluyó aproximadamente 4 veces con solución de acetato sódico 10 mM a pH 4,85, de forma que la D.O. 280 nm pasó de 42,8 UA hasta 10,7 UA, y se le añadió NaCl hasta llevar a una concentración final de 0,275 moles por litro de solución, ajustándose el pH a 4,85 con HCl 0,1 M. La proporción de polímero determinada por HPLC fue del 0,88%. Inmediatamente después se inyectó en una columna con resinas de intercambio catiónico de poliestireno (POROS-HS® de 50 μm) y de 8,0 ml de volumen (0,8 cm² de sección transversal x 10 cm de altura), a un caudal de unos 20 VC/hora aproximadamente. Se tomaron muestras del efluente de columna para distintos volúmenes de carga (VC) aplicados así como para el pool final, determinándose la distribución molecular (polímeros de alto peso molecular) por HPLC y la reducción obtenida. Los valores hallados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17

Carga		Polímero (%)	Reducción Polímero (%)
Volúmenes de carga (VC)	mg IgG/ml gel		
2	15	$\leq 0,06$	≥ 93
25	192	$\leq 0,06$	≥ 93
50	385	$\leq 0,06$	≥ 93
Pool	385	$\leq 0,06$	≥ 93

Los resultados obtenidos demuestran que en las mejores condiciones de proceso de adsorción es posible retener todos los polímeros (hasta $\leq 0,06\%$) formados en la pasteurización de la IgG previamente purificada por fraccionamiento etanólico y con una alta carga de inyección (385 mg de IgG/ml de resina).

Ejemplo 14

Esta prueba se diseñó para determinar la viabilidad del proceso de obtención integrando distintas etapas de purificación en una sola. Se pretendía determinar si procede combinar la adsorción de polímeros con una etapa previa opcional de tratamiento con disolvente-detergente y posterior adsorción de dichos reactivos.

Para ello, se partió de Fr-II+III y se procesó igual que en el ejemplo 3 hasta obtener una solución a granel pasteurizada. Esta solución se diluyó hasta una D.O. 280nm de 28 ± 1 UA (aproximadamente 2% de proteína) y se le añadió una solución concentrada (x 10 veces) de disolvente-detergente, formada por tri-n-butil fosfato y Triton X-100, hasta llevar a las concentraciones finales de $0,3 \pm 0,1\%$ y $1,0 \pm 0,3\%$ respectivamente. La solución se llevó a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y se mantuvo unos 30 min en homogenización. Luego se transfirió a otro recipiente adecuado para someterla a incubación durante unas 6 horas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Finalizado el tratamiento se procedió a diluir la solución un 10% con solución de acetato sódico 100 mM y NaCl 2,75 M, de forma que las concentraciones finales fuesen 1/10 parte de las añadidas y la concentración de proteína de 16,5 mg/ml. El pH de la solución se ajustó a $4,85 \pm 0,05$ con HCl 0,1 M, si fue necesario, dando lugar a un volumen de 167 ml.

Previamente se acondicionó una columna, de 17,5 ml de volumen y 10 cm de altura, de resina hidrófoba (hidrocarburo C8) y una matriz con grupos silanol (SDR-HyperD® de Pall, Estados Unidos), y otra columna de resinas catiónicas POROS-HS® (50 μm , Applied Biosystem, Estados Unidos) de 8,0 ml de volumen. Ambas columnas se conectaron en serie, de forma que la primera (SDR-HyperD®) alimentaba a la segunda (POROS-HS®), y se acondicionaron haciendo fluir solución de equilibrado formada por acetato sódico 10 mM, NaCl 0,275 M y pH $4,85 \pm 0,05$, a un caudal equivalente a 6 VC/h y 13 VC/h para la primera y segunda columna, respectivamente.

La solución de IgG anteriormente preparada (167 ml) se inyectó a la primera columna SDR-HyperD® y el efluente de ésta alimentó a la segunda columna POROS-HS®. Los volúmenes de carga calculados para cada columna fueron de: 1) $167 \text{ ml}/17,5 \text{ ml} = 9,5$ VC para la columna de SDR-HyperD®; 2) $167 \text{ ml}/8,0 \text{ ml} = 21$ VC para la columna de POROS-HS®. El caudal de inyección durante todo el proceso fue de 6 y 13 VC/h, para la primera y segunda columna, respectivamente. Al final de la carga se realizó un post-lavado con unos 2 VC de solución de equilibrado, recogiendo en pool todo el efluente de las columnas.

Los resultados de distribución molecular (HPLC) y proteína (por D.O. 280 nm) de cada etapa se resumen en la tabla 18.

Tabla 18

ETAPA	Polímero (%)	Proteína (%)	Recuperación (%)
Pasteurizado	2,22	2,75	100
Tratado SD	3,67	1,80	100
Ajustado	3,67	1,65	100
Efluente SDR+POROS	$\leq 0,06$	1,58	95,7

Los anteriores resultados ponen de manifiesto que el proceso de adsorción de polímeros puede integrarse y simultanearse perfectamente con otras etapas de proceso, por lo que se reduce el tiempo global, así como el consumo de reactivos en el acondicionamiento previo y en el lavado posterior.

Ejemplo 15

Se analizó la capacidad de retención de polímero de distintas resinas catiónicas disponibles comercialmente para lograr la mejor separación posible con respecto a monómeros/dímeros de IgG. Para ello se procedió a comparar matrices de resinas de distinto origen, en especial la acrílica (Toyopearl®) frente a la de agarosa (Sephacrose®). Se empaquetaron las resinas en sendas columnas de $1,75 \text{ cm}^2$ de sección transversal y 100 mm de altura empaquetada (XK16® de GE-Healthcare) con las resinas GigaCap Toyopearl-S 650®, y SP-Sephacrose XL®.

El material de partida era una mezcla de distintos lotes de solución de IgG pasteurizada tratada como en el ejemplo 3, a la que se añadió NaCl hasta 0,275 M y 0,20 M, ajustándose a pH $4,85 \pm 0,05$ con HCl 0,1 M, si fue necesario. Las soluciones presentaban unas 22 UA de concentración proteica y se inyectaron hasta 50 VC a un caudal de unos 15 VC/h en columnas preparadas y acondicionadas a las mismas concentraciones de NaCl y pH que la solución de IgG a ensayar.

Los resultados de recuperación de polímero obtenidos a distintos volúmenes de columna usados con respecto al inicial se reflejan en la tabla 19.

Tabla 19

Resina	Carga		(%) Recuperación polímero	
	VC	mg proteína/ml gel	NaCl (0,275 M)	NaCl (0,200 M)
GigaCap ToyoPearl-S 650M	0	0	100	100
	10	158	97	15
	25	396	100	73
	40	633	104	97
	50	791	110	110
SP-Sepharose XL	0	0	100	100
	10	158	98	89
	25	396	100	95
	40	633	103	95
	50	791	95	91

La recuperación de proteína total varía del 98% al 100% para la resina SP-Sepharose XL, y del 90% al 100% para la GigaCap-S 650M (un 98% a 10 VC y NaCl 0,2 M)

De los anteriores resultados se demuestra que las resinas catiónicas acrílicas (tipo GigaCap-S® 650M) al igual que la POROS-HS® (poliestireno catiónico), son capaces de retener selectivamente el polímero formado por pasteurización de la IgG, con una capacidad de reducción del 85% del polímero presente (recuperación del 15%) a una carga de proteína de 158 mg/ml de gel y recuperación de proteína total del 98%. Obviamente, en función del pH (reducción) puede optimizarse el resultado obtenido, mejorando la capacidad de carga para alcanzar, por ejemplo, unos 25 VC (396 mg proteína/ml gel).

Se ha constatado que las resinas procedentes de matrices no sintéticas de tipo agarosa (Sepharose XL) no tienen suficiente capacidad de resolución para la separación de polímeros frente a monómeros/dímeros de IgG en las condiciones explícitas de adsorción selectiva de los primeros en el efluente de carga.

Asimismo, puede observarse que las condiciones más apropiadas de pH y concentración de NaCl son específicas del tipo de resina sintética de perfusión empleado. Así pues, para una resina acrílica tipo GigaCap-S® 650M, a pH 4,85, se requiere no más de 0,2 M de NaCl, y en cambio sería necesario un 0,3 M de NaCl para la resina POROS-HS® 50 μ m.

Queda claro que un experto en la materia encontrará la relación entre pH y concentración de NaCl más adecuada para cada tipo de resina sintética de perfusión.

Ejemplo 16

Se procedió a verificar la escalabilidad del proceso por etapas, hasta producto final formulado y concentrado como IGIV al 10% de proteína, comprobando las características de composición del producto.

A partir de un pool de plasma de más de 1000 litros se procedió a su fraccionamiento con etanol hasta obtener una Fr-II+III y se continuó su purificación hasta obtener una solución a granel pasteurizada, tal y como se ha descrito en el ejemplo 3.

Se tomaron 6,34 kg de la anterior solución pasteurizada (equivalentes a unos 26,2 litros de plasma de partida), una vez diluida con agua para inyección hasta una densidad óptica de 27,98 UA (280 nm) y 0,26 mS/cm de conductividad, comprobando que su pH era de 4,65. Se añadieron unos 0,70 kg de solución concentrada (x 10 veces) de tri-n-butilfosfato al 3% y Triton X-100 al 10%, durante unos 5-10 min y bajo agitación intensa. El pH se ajustó a 4,79 por adición de NaOH 0,1 M. Se obtuvieron unos 7,04 kg de solución y se incubó a temperatura ambiente (18-25°C) hasta 6 horas. Se determinó el contenido de tri-n-butilfosfato por cromatografía de gases siendo del 0,28% (2800 ppm).

Posteriormente, se añadió solución de NaCl 1,5 M, conteniendo acetato sódico 10 mM a pH 4,85, hasta llevar a la concentración final de 0,275 M de NaCl. El pH resultante fue 4,81. Seguidamente se tomaron 6930,9 g de la solución y se inyectaron a una columna de 140 mm de diámetro que contenía 770 ml de resinas SDR-HyperD® (de Pall) siendo la altura de resina de 50 mm. La inyección se realizó a temperatura ambiente y a un caudal equivalente a 6,1 VC/hora, de forma que se cargó toda la solución en menos de 2 horas. La relación de carga total resultante fue de 9 VC (6,93 kg/0,770 l = 9,0 VC). Posteriormente se llevó a cabo un post-lavado con 3 VC de solución de NaCl 0,275 M y acetato sódico 10 mM a pH 4,85. Se obtuvieron 6,93 kg de efluente de columna recogidos durante la inyección de la solución de producto, siendo el pH de 4,82 y la conductividad de 16,75 mS/cm. El contenido de tri-n-butilfosfato era $\leq$ 5 ppm determinado analíticamente por cromatografía de gases.

Se tomaron 5,772 kg del anterior efluente y se inyectaron en una columna de 222 ml de resinas POROS HS® (50 μ m), siendo el diámetro de columna de 50 mm y la altura del lecho de 113 mm. La solución se inyectó a la columna

a temperatura ambiente y a un caudal aproximado de unos 10 VC/hora, de forma que el proceso duró unas 2,5 horas. Se recogió todo el efluente de columna obtenido durante la carga del producto y se le unió 1 VC de post-lavado con solución de NaCl 0,275 M, acetato sódico 10 mM y sorbitol al 17% (peso/peso) a pH 4,85. Se obtuvieron 5,776 kg del pool efluente de columna recogidos durante la inyección de la solución de producto, siendo la densidad óptica de 18,508 UA (280nm), el pH de 4,84 y la conductividad de 16,95 mS/cm.

El anterior pool de efluente se clarificó filtrándose por 0,1 μ m y luego se nanofiltró en serie por gradiente de poros de 35 nm (Planova® 35N) + 20 nm (Planova® 20N). Al finalizar la nanofiltración del producto se post-lavó con un volumen equivalente a un 5% del volumen recogido de la misma solución de post-lavado utilizada en la columna POROS HS®, siendo el tiempo total de proceso de unas 18 horas. La cantidad del nanofiltrado obtenido fue de 6,797 kg, el pH de 4,83, la turbidez 2,71 NTU y la conductividad de 17,1 mS/cm.

La solución nanofiltrada se ultrafiltró por membrana de polietersulfona de 100 kDa de valor de corte molecular nominal. En primer lugar, se concentró el producto 3,3 veces, desde una densidad óptica de 14,4 UA (280nm) hasta aproximadamente 50 ± 10 UA (280 nm), posteriormente se diafiltró a volumen constante frente a aproximadamente 7 volúmenes de solución de diálisis compuesta por ácido acético 2 mM ajustado con NaOH hasta pH $4,2 \pm 0,2$. Después de comprobar la conductividad (220 μ S/cm), se añadió cantidad suficiente de solución de sorbitol concentrada al 33% para llevar a la concentración final de sorbitol del 5% (peso/volumen) aproximadamente. Finalmente se concentró unas 3,5 veces hasta llevar a una densidad óptica 140 ± 5 UA (280nm), equivalente a aproximadamente un 10% de proteína, y se ajustó el pH a $5,25 \pm 0,25$ con NaOH 0,1 M. Se obtuvieron 552,1 g de solución a un pH final de 5,26, con una turbidez de 5,45 NTU y una conductividad de 1,18 mS/cm. Esta solución se filtró por 0,22 μ m y se dosificó en viales, siendo el pH de 5,34, la osmolalidad de 330 mOsm/kg, la turbidez de 4,62 NTU y la conductividad de 1,34 mS/cm. El tiempo de proceso en esta fase fue de 9,5 horas. Los viales dosificados se mantuvieron a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante más de 15 días sin mostrar signos de gelificación, ni enturbiamiento o sedimentación, cambios de coloración o aparición de fibras o partículas visibles.

En la tabla 20 se muestran los resultados de polímeros, dímero, monómero y fracciones, en las distintas etapas del proceso global de obtención.

Tabla 20

Etapas del proceso	Polímero (%)	Dímero (%)	Monómero (%)	Fracciones (%)
Pasteurizado	2,0	3,2	94,8	0
Efluente SDR	2,7	2,6	94,1	0,6
Efluente POROS	$\leq 0,06$	1,9	98,1	0
Nanofiltrado	$\leq 0,06$	3,0	96,5	0,5
Conc final (0,2 μ)	$\leq 0,06$	4,3	95,6	0,1

De los resultados anteriores se destaca que el control sobre el contenido de dímero ($\leq 5\%$), que se realiza como se ha ilustrado anteriormente en los ejemplos previos mediante el ajuste del pH y la concentración de sal, en el producto antes de columna POROS (en Pasteurizado y Efluente SDR) posibilita una excelente adsorción del polímero presente ($\leq 0,06\%$), minimizando las pérdidas de IgG dimérica (2,6% en efluente SDR y 1,9% en efluente POROS).

Se concluye que el proceso global de obtención de IGIV, integrando la etapa de eliminación de agregados/polímeros al tratamiento con SD y su separación, así como la nanofiltración, diafiltración y formulación final, es totalmente viable y escalable, habiéndose obtenido valores excelentes en el producto final en cuanto a contenido de polímero ($\leq 0,06\%$) y fracciones (0,1%).

Ejemplo 17

El producto obtenido (IGIV al 10%) del ejemplo 16, dosificado en viales de vidrio de 20 ml a razón de 10 ml por vial, herméticamente cerrados con tapón de caucho-butilo de 20 mm $\varnothing$, se almacenó protegido de la luz durante 12 meses a temperatura ambiente ($25 \pm 5^{\circ}\text{C}$). Al tiempo establecido de aproximadamente 1 año se procedió a su inspección visual (aspecto físico) y a la determinación analítica de los parámetros más representativos de estabilidad. Los valores obtenidos al inicio ($t = 0$) y final de conservación ($t = 1$ año) se muestran en la tabla 21. Asimismo, también se incluyen los valores normales obtenidos a escala industrial usando el estado de la técnica (Patente ES-200100101).

Tabla 21

PARÁMETRO	TIEMPO = 0	TIEMPO = 1 año (T: 20-30°C)	Especificaciones (Eur.Ph.)
pH	5,34	5,28	4,0-7,4
Turbidez (NTU)	4,62	7,09	n.e
Conductividad (mS/cm)	1,34	0,63	n.e
Osmolalidad (mOs/kg)	330	357	≥ 240
Polímeros (% HPLC)	≤0,06	0,27	≤3,0
Fragmentos (% HPLC)	0,09	0,92	≤5,0
IgG ₁ (%)	67,7	67,5	(equivalente al plasma)
IgG ₂ (%)	26,2	26,2	(equivalente al plasma)
IgG ₃ (%)	3,3	3,1	(equivalente al plasma)
IgG ₄ (%)	2,7	2,6	(equivalente al plasma)
PKA (UI/ml)	<2	<2	≤25
ACA (CH ₂₀ /mg)	0,79	0,89	≤1
n.e.: no establecido; Eur.Ph.: Farmacopea Europea.			

- 5 En cuanto al aspecto físico visual se comprobó la ausencia de alteración en las muestras, tanto por presencia de partículas (fibras, grumos o sedimentos), como por turbidez (transparente) o coloración (incoloro). Se concluye que el producto obtenido se conserva esencialmente inalterado (polímeros, enzimas como PKA, ACA, etc.) durante 1 año a temperatura ambiente de $25 \pm 5^\circ\text{C}$, cumpliendo el producto los valores establecidos en la Farmacopea Europea (Eur.Ph.).

10 Ejemplo 18

- Se procesó un lote a un tamaño de escala preparativa equivalente al ejemplo 16 con la única diferencia en el orden secuencial de las etapas de inactivación vírica, de forma que a partir del material inicial diafiltrado seguidamente se llevó a cabo el tratamiento con SD, luego la adsorción de estos reactivos con resinas SDR-HyperD®, y a continuación el resto de pasos de proceso requeridos para la obtención del producto de la invención, o sea la pasteurización en presencia de sorbitol y la captura de agregados moleculares con resinas de perfusión POROS HS, de la misma forma que en el ejemplo 16. Finalmente, el producto obtenido, estabilizado con sorbitol al 5% se llevó a la concentración proteica del 10% de IGIV, esterilizándose por filtración y dosificándose a viales de 20 ml de vidrio. Los viales herméticamente cerrados con tapón de caucho-butilo se almacenaron en cámara fría a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 1 año, y luego se determinaron los parámetros más relevantes de estabilidad incluyendo la inspección visual. Los resultados obtenidos al inicio ($t = 0$) y después de la conservación ($t = 1$ año, aproximadamente), así como los valores de especificaciones de Eur.Ph. se hallan en la tabla 22.

Tabla 22

PARÁMETRO	TIEMPO = 0	TIEMPO = 1 año (T: 2-8°C)	Especificaciones (Eur.Ph.)
pH	5,23	5,18	4,0-7,4
Turbidez (NTU)	7,6	6,0	n.e.
Conductividad (mS/cm)	1,45	0,64	n.e.
Osmolalidad (mOs/kg)	384	399	≥ 240
Polímeros (% HPLC)	0,30	0,40	≤3,0
Fragmentos (% HPLC)	0	0,32	≤5,0
IgG ₁ (%)	67,6	70,2	(equivalente al plasma)
IgG ₂ (%)	25,4	26,9	(equivalente al plasma)
IgG ₃ (%)	4,2	4,0	(equivalente al plasma)
IgG ₄ (%)	2,8	3,2	(equivalente al plasma)
PKA (UI/ml)	<2	<2	≤25
ACA (CH ₂₀ /mg)	0,64	0,85	≤1
n.e.: no establecido; Eur.Ph.: Farmacopea Europea.			

- 5 En cuanto al aspecto físico visual se comprobó la ausencia de alteración en las muestras, tanto por presencia de partículas (fibras, grumos o sedimentos), como por turbidez (transparente) o coloración (incoloro). El producto obtenido se conserva esencialmente inalterado (por ejemplo, polímeros/fragmentos y enzimas proteolíticos como PKA) más allá de aproximadamente 1 año a temperatura de $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$, cumpliendo el producto los valores establecidos en la Farmacopea Europea (Eur.Ph.).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de una composición de IgG a partir de una solución de IgG parcialmente purificada de plasma humano con un contenido de IgG mayor del 95% con respecto al total de proteínas, que comprende las etapas de:
 - a) diafiltrar la solución de IgG parcialmente purificada;
 - b) estabilizar la solución obtenida en la etapa a);
 - c) tratar térmicamente la solución obtenida en la etapa b);
 - d) adsorber de la solución tratada térmicamente en la etapa c) los agregados y/o polímeros de alto peso molecular de forma selectiva mediante cromatografía catiónica; y
 - e) diafiltrar y formular la solución obtenida en la etapa d).
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho procedimiento se lleva a cabo a partir de una solución de IgG purificada del plasma humano con un contenido de IgG respecto al total de proteínas mayor del 97%.
3. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado porque** la etapa de diafiltración (a) se lleva a cabo hasta que la concentración de etanol es menor del 0,1% (peso/volumen).
4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la etapa de diafiltración (a) se lleva a cabo hasta que la concentración de los reactivos de precipitación no desnaturalizados tales como PEG, ácido octanoico, detergentes no iónicos compatibles, o cualquier mezcla de los mismos, es menor de un 2% (peso/volumen) y en cualquier caso no provocan más del 3% de polímero después de la etapa c).
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la etapa de diafiltración (a) se lleva a cabo hasta que la fuerza iónica de la solución de IgG de partida es menor de 1 mS/cm.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el valor de pH al final de la etapa (a) se encuentra en el intervalo entre 4,2 y 6,0.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la etapa de diafiltración (a) se lleva a cabo con agua para inyección o con una solución tampón de baja fuerza iónica.
8. Procedimiento, según la reivindicación 7, **caracterizado porque** la solución tampón de baja fuerza iónica es una solución de ácido acético o acetato sódico ≤ 5 mM, que tiene un pH entre 4,0 y 5,0.
9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la etapa de diafiltración (a) se lleva a cabo en modo de flujo tangencial a través de membranas con un valor de corte molecular de entre 10 kDa y 100 kDa.
10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** en la etapa de diafiltración (a) las proteínas se concentran hasta una concentración no mayor de aproximadamente el 5% (peso/volumen), preferentemente entre un 2% y un 4% (peso/volumen).
11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** en la etapa de estabilización (b) se utiliza sorbitol como agente estabilizante.
12. Procedimiento, según la reivindicación 11, **caracterizado porque** la concentración del sorbitol utilizado en la etapa de estabilización (b) es menor del 50% (peso/peso), y preferentemente se encuentra entre el 30% y el 35% en peso.
13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** en la etapa de estabilización (b) el pH se ajusta a entre 4,6 y 5,2.
14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el tratamiento térmico (etapa c) se lleva a cabo a una temperatura entre 55°C y 63°C, durante un tiempo entre 1 y 24 horas.
15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** el tratamiento térmico (etapa c) se lleva a cabo a una temperatura de $60 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 10-11 horas.
16. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la etapa de adsorción selectiva se lleva a cabo en una columna cromatográfica de intercambio catiónico fuerte.
17. Procedimiento, según la reivindicación 16, **caracterizado porque** la resina de intercambio catiónico fuerte comprende, como mínimo, uno de los grupos sulfónicos catiónicos tales como grupos sulfonilo, sulfónico, o sulfopropilo, unido covalentemente a una matriz sintética insoluble de perfusión, que comprende polimetacrilato o

poliestireno y cuyo tamaño de partículas oscila entre 20 y 100 µm.

18. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** en la etapa de adsorción selectiva el caudal de inyección es de 5-30 volúmenes de columna/hora.

19. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** a la solución tratada térmicamente en la etapa c) se le añade cloruro sódico hasta una concentración final entre 0,2 y 0,5 M (mol/litro).

20. Procedimiento, según la reivindicación 19, **caracterizado porque** la solución de la etapa c), después de añadir el cloruro sódico, se ajusta a un pH entre 4,2 y 5,5.

21. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** en la etapa de adsorción selectiva se utilizan entre 1 y 10 litros de resina por cada kg de IgG (seca) a purificar, lo que equivale a una carga de entre 100 y 1000 mg de IgG/ml de resina.

22. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** en la etapa de adsorción selectiva la elución se lleva a cabo utilizando un gradiente salino decreciente.

23. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** dicho procedimiento comprende, como mínimo, una etapa adicional de tratamiento de inactivación/eliminación vírica.

24. Procedimiento, según la reivindicación 23, **caracterizado porque** las etapas adicionales de tratamiento de inactivación/eliminación vírica se llevan a cabo antes o después de la etapa de tratamiento térmico.

25. Procedimiento, según la reivindicación 23, **caracterizado porque** la etapa adicional de tratamiento de inactivación/eliminación vírica se lleva a cabo por incubación a pH ácido en presencia o ausencia de pepsina, o mediante tratamiento con detergentes no iónicos, disolventes iónicos o mediante nanofiltración

26. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la etapa de diafiltración (e) se lleva a cabo con agua para inyección o con una solución tampón de baja fuerza iónica.

27. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** en la etapa de diafiltración (e) se añaden estabilizantes para la formulación final.

28. Procedimiento, según la reivindicación 27, **caracterizado porque** el pH de la formulación final se encuentra entre 4,6 y 5,8.

29. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** la etapa de diafiltración (e) se lleva a cabo en modo de flujo tangencial a través de membranas con un valor de corte molecular de entre 10 kDa y 100 kDa.

30. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado porque** en la etapa de diafiltración (e) las proteínas se concentran hasta un valor entre un 5% y un 22% (p/v).