

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 477**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2011 PCT/US2011/064069**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12082532**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2011 E 11811594 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2651962**

54 Título: **Monitorización en tiempo real y control de procedimientos de producción de proteínas usando espectroscopía de impedancia**

30 Prioridad:

**16.12.2010 US 423891 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.02.2017**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)  
Thurgauerstrasse 130  
8152 Glattpark, Opfikon, CH y  
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WAUTERS, CARY y  
ZAYDENBERG, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

**ES 2 603 477 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**

Monitorización en tiempo real y control de procedimientos de producción de proteínas usando espectroscopía de impedancia

5

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud provisional estadounidense nº 61/423.891, presentada el 16 de diciembre de 2010.

10

**Campo de invención**

La invención se refiere en general a espectroscopía de impedancia electroquímica y, más específicamente, a métodos de monitorización, ajuste y/o control en proceso de procedimientos de preparación de suspensiones de proteínas y/o procedimientos de separación de proteínas de fluidos biológicos usando espectroscopía de impedancia electroquímica.

15

**Antecedentes**

20

Las proteínas del plasma sanguíneo sirven para una amplia variedad de funciones en el cuerpo humano tales como el mantenimiento del volumen sanguíneo, la presión osmótica, la viscosidad y otros parámetros físicos importantes de la sangre. Se han implementado varios procedimientos comerciales para separar y purificar estas proteínas del plasma sanguíneo para uso terapéutico. Algunos métodos comunes para la purificación de proteínas incluyen precipitación con sulfato de amonio y sales similares, precipitación con disolventes orgánicos con etanol frío o acetona y otros de tales alcoholes y cetonas, adsorción selectiva sobre geles, precipitación isoeléctrica y cromatografía mediante el uso de adsorbentes. Todavía otros procedimientos para fraccionar y purificar selectivamente proteínas sanguíneas implican el uso de aminoácidos, polímeros orgánicos solubles en agua y polímeros de polielectrolitos insolubles en agua que contienen grupos amino básicos.

25

30

Muchas técnicas de extracción y purificación de proteínas se basan en alterar la solubilidad de una proteína deseada en un fluido biológico tal como plasma sanguíneo o una disolución de plasma ajustando cualquier número de propiedades de la disolución de proteína. A través de la adición de sales o la dilución de una disolución, puede llevarse a cabo la separación en el intervalo de bajas fuerzas iónicas en las que las interacciones de proteínas con electrolitos difieren entre sí, tanto en el estado isoeléctrico como cuando se disocian como ácidos o bases. La solubilidad de una proteína también puede reducirse mediante la adición de alcoholes, acetona u otros disolventes orgánicos miscibles con agua a disoluciones de proteína. El equilibrio entre la acción de precipitación de los alcoholes y las interacciones con sales permite el logro de una variedad de condiciones en las que la proteína que va a separarse puede llevarse a una solubilidad deseada. Este equilibrio puede alterarse basándose en el pH y la temperatura para cada componente proteico; sin embargo, para evitar la desnaturalización de la proteína deseada, deben mantenerse temperaturas suficientemente bajas. Además, el pH puede controlarse añadiendo un tampón tal como un acetato u otros tampones de fuerza iónica conocida, y ajustarse para aprovecharse de las diferencias en los puntos isoeléctricos y las direcciones de las interacciones con sales de los componentes proteicos que van a separarse. Finalmente, la concentración de proteína puede mantenerse tan baja como sea posible para obtener una cantidad deseada de precipitado proteico para minimizar las interacciones proteína-proteína. A medida que el número de componentes en la disolución o suspensión aumenta o si múltiples componentes tienen propiedades fisicoquímicas similares, deben controlarse de manera precisa más de estas variables para disminuir la solubilidad de un único tipo de proteína.

35

40

45

50

Debido a que estas proteínas plasmáticas extraídas y/o purificadas pueden usarse terapéuticamente en humanos, tales procedimientos de extracción y purificación requieren un control de calidad riguroso, tal como monitorización y pruebas analíticas del fluido biológico para garantizar que el producto final es tanto constante como seguro, y que las propiedades químicas de la mezcla se mantienen constantes con el diseño de procedimiento previsto. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de monitorización convencionales tales como el uso de ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas ("ELISA") o resonancia de plasmón superficial para determinar la cantidad de actividad de anticuerpos en una muestra preparada. Otros métodos de monitorización comunes tales como cromatografía de fase inversa, de afinidad o de intercambio catiónico requieren la preparación de muestras y controles y la incubación durante un determinado periodo de tiempo para monitorizar la degradación de proteínas. Adicionalmente, pueden usarse técnicas de electroforesis de SDS-Page para determinar las impurezas de anticuerpos.

55

60

65

Desafortunadamente, muchas de estas técnicas de control y monitorización conocidas son costosas y pueden requerir antígenos, reactivos y equipo especializados para realizar los análisis requeridos. De hecho, muchas de estas técnicas conocidas no son adecuadas para monitorizar y controlar procedimientos de separación en tiempo real, ya que requieren preparación de muestras, tiempos de incubación específicos y/u otras etapas que requieren mucho tiempo. El documento US2007/240505 se refiere a un analizador y detector del nivel de fluido.

Existe, por tanto, la necesidad de métodos y sistemas de tecnología analítica de procesos (PAT) para la monitorización en proceso de suspensiones y disoluciones de manera mejorada que puede potenciar la comprensión de procesos con proteínas, mejorar el control de procesos y/o lograr una calidad de producto constante. Tal como se usa en el presente documento, PAT incluye, por ejemplo, un sistema para diseñar, analizar y/o controlar la fabricación a través de mediciones oportunas (es decir, durante el procesamiento) de atributos de rendimiento y calidad críticos de procesos y materiales en proceso y de partida con el objetivo de garantizar la calidad del producto final. Sería beneficioso si estos atributos pudieran obtenerse usando un método que sea rápido, fiable, con bajo mantenimiento y que implique una facilidad en el uso de equipo, tal como el uso de equipo que no es necesario dismantelar o el uso de sensores que se limpien fácilmente.

## Sumario

La invención actual se define, entre otros, mediante los siguientes puntos:

1. Un método para separar una proteína de un fluido biológico hasta un grado seleccionado como objetivo, comprendiendo el método:

ajustar un parámetro de dicho fluido biológico para modificar la solubilidad de dicha proteína en dicho fluido biológico, seleccionándose dicho fluido biológico del grupo que consiste en un plasma sanguíneo y un producto intermedio de plasma fraccionado, y seleccionándose dicho parámetro del grupo que consiste en concentración de solutos, concentración de disolvente, pH, fuerza iónica, temperatura, densidad, velocidad de flujo y viscosidad;

monitorizar la impedancia del fluido biológico durante dicha etapa de ajuste;

comparar dicha impedancia con un valor de impedancia objetivo correspondiente a un grado objetivo de separación de dicha proteína de dicho fluido biológico; y

provocar un aumento o una disminución en la solubilidad de dicha proteína en dicho fluido biológico modificando adicionalmente dicho parámetro cuando dicha impedancia se desvíe de dicho valor de impedancia objetivo en más de una tolerancia aceptable para llevar dicho valor de impedancia dentro de dicha tolerancia aceptable de dicho valor de impedancia objetivo;

efectuando de ese modo la separación hasta dicho grado seleccionado como objetivo.

2. El método según el punto 1, en el que el producto de plasma fraccionado se selecciona del grupo que consiste en albúmina, inhibidor de alfa1-proteinasa, factor antihemofílico, complejo de factor de von Willebrand, complejo coagulante anti-inhibidor, antitrombina, inhibidor de esterasa C1, factores de coagulación, fibrina, fibrinógeno, inmunoglobulina, concentrado de proteína C y trombina.

3. El método según el punto 1 ó 2, en el que dicha etapa de modificación comprende modificar adicionalmente dicho parámetro cuando dicha impedancia se desvíe de dicho valor de impedancia objetivo en al menos el 0,5%.

4. El método según el punto 3, en el que dicha etapa de modificación comprende modificar adicionalmente dicho parámetro cuando dicha impedancia se desvíe de dicho valor de impedancia objetivo en al menos el 1,0%.

5. El método según el punto 4, en el que dicha etapa de modificación comprende modificar adicionalmente dicho parámetro cuando dicha impedancia se desvíe de dicho valor de impedancia objetivo en al menos el 5%.

6. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha etapa de modificación comprende proporcionar una notificación a un operario cuando dicha impedancia se desvíe de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable.

7. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha etapa de modificación comprende además desencadenar un análisis de dicho fluido biológico cuando dicha impedancia se desvíe de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable.

8. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que dicha etapa de modificación comprende:

determinar una cantidad de modificación de dicho parámetro necesaria para provocar que la impedancia de dicho fluido biológico esté en o aproximadamente en dicho valor de impedancia objetivo cuando dicha impedancia se desvíe de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable; y

modificar el parámetro en dicha cantidad de modificación.

9. El método según uno cualquiera de los puntos 1-7, en el que dicha etapa de modificación comprende modificar automáticamente dicho parámetro cuando dicha impedancia se desvíe de dicho valor de impedancia objetivo en más

de dicha tolerancia aceptable.

10. El método según el punto 9, en el que dicha etapa de modificación se realiza sustancialmente en tiempo real.

5 11. Un método para controlar un procedimiento de separación de proteínas para separar una proteína de un fluido biológico, comprendiendo dicho método:

10 obtener una medición de impedancia de dicho fluido biológico de una etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas, seleccionándose dicho fluido biológico del grupo que consiste en un plasma sanguíneo y un producto intermedio de plasma fraccionado;

15 determinar una cantidad de modificación de un parámetro de dicho fluido biológico que modifica la solubilidad de dicha proteína en dicho fluido biológico necesaria para provocar que la medición de impedancia de dicho fluido biológico esté dentro de una tolerancia aceptable de un valor de impedancia objetivo, seleccionándose dicho parámetro del grupo que consiste en concentración de solutos, concentración de disolvente, pH, fuerza iónica, temperatura, densidad, velocidad de flujo y viscosidad; y

20 provocar un aumento o una disminución en la solubilidad de dicha proteína en dicho fluido biológico ajustando dicho parámetro que modifica la solubilidad de dicha proteína en dicho fluido biológico en dicha cantidad de modificación para llevar dicho valor de impedancia dentro de dicha tolerancia aceptable de dicho valor de impedancia objetivo;

controlando de ese modo dicho procedimiento de separación de proteínas.

25 12. El método según el punto 11, caracterizado además porque dicha etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas comprende precipitar dicha proteína de dicho fluido biológico.

13. El método según el punto 11, caracterizado además porque dicha etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas comprende purificar o concentrar dicha proteína.

30 14. El método según el punto 11, caracterizado además porque dicha etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas comprende un procedimiento de flujo continuo y dicho fluido biológico es un fluido biológico en línea de dicho procedimiento de flujo continuo.

35 15. El método según el punto 11, caracterizado además porque dicha etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas comprende un procedimiento discontinuo y dicho fluido biológico es una mezcla discontinua de dicho procedimiento discontinuo.

40 16. El método según el punto 11, caracterizado además porque dicha etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas comprende un procedimiento de filtración.

17. El método según uno cualquiera de los puntos 11-16, caracterizado además porque dicha etapa de determinación comprende proporcionar una notificación a un operario cuando dicha medición se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable.

45 18. El método según uno cualquiera de los puntos 11-17, caracterizado además porque dicha etapa de ajuste comprende desencadenar un análisis de dicho fluido biológico cuando dicha medición se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable.

50 19. El método según uno cualquiera de los puntos 11-17, caracterizado además porque dicha etapa de ajuste comprende ajustar automáticamente dicho parámetro cuando dicha medición se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable.

20. El método según el punto 19, en el que dicha etapa de ajuste se realiza sustancialmente en tiempo real.

55 21. El método según uno cualquiera de los puntos 11-20, caracterizado además porque el producto de plasma fraccionado se selecciona del grupo que consiste en albúmina, inhibidor de alfa1-proteinasa, factor antihemofílico, complejo de factor de von Willebrand, complejo coagulante anti-inhibidor, antitrombina, inhibidor de esterasa C1, factores de coagulación, fibrina, fibrinógeno, inmunoglobulinas, concentrado de proteína C y trombina.

60 22. El método según uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el fluido biológico se usa en una cantidad de 1,6 l a 10 l.

23. El método según uno cualquiera de los puntos 1-21, en el que la separación de proteínas se realiza a gran escala.

65 Se ha encontrado que puede usarse espectroscopía de impedancia (IS) para caracterizar las propiedades eléctricas y/o electroquímicas de muchos tipos de disoluciones, suspensiones y coloides de proteínas, incluyendo fluidos

biológicos tales como plasma sanguíneo, fracciones de plasma sanguíneo y disoluciones de plasma sanguíneo. Las realizaciones a modo de ejemplo descritas en el presente documento utilizan IS para una monitorización y/o un control en proceso rápido y fiable de parámetros de procedimiento durante procedimientos de preparación de disoluciones de proteínas, procedimientos de extracción de proteínas, procedimientos de purificación de proteínas, y/o procedimientos de almacenamiento de fracciones de proteínas.

Tal como se describe más adelante, determinadas realizaciones de la invención permiten la medición de la impedancia de una mezcla que contiene proteínas implicada en un procedimiento de proteínas. Tales mediciones de impedancia pueden usarse para determinar y/o controlar un parámetro del procedimiento de proteínas y/o la mezcla mediante comparación con un valor de impedancia de referencia o intervalo de referencia de valores de impedancia, sin la necesidad de ralentizar o detener el procedimiento. Los sistemas y métodos divulgados, por tanto, pueden mejorar las capacidades de control del procedimiento, facilitar ajustes del procedimiento oportunos y/o pueden ayudar en la preparación de producto que tiene una calidad consistente al permitir a un profesional acceder en tiempo real o casi en tiempo real a información sobre propiedades de mezclas que contienen proteínas, sin la necesidad de procedimientos de preparación de muestras u otros procedimientos de prueba que requieren tiempo.

Un aspecto es proporcionar un método para separar una proteína de un fluido biológico. Puede ajustarse un parámetro que modifica la solubilidad de una proteína en un fluido biológico y la impedancia del fluido biológico puede monitorizarse antes, durante y/o después del ajuste del parámetro. La impedancia del fluido biológico puede compararse con un valor de impedancia objetivo, que puede corresponder a un grado objetivo de separación de la proteína del fluido biológico. El parámetro que modifica la solubilidad puede modificarse adicionalmente cuando la impedancia se desvía del valor de impedancia objetivo en más de una tolerancia aceptable. La modificación adicional puede incluir determinar una cantidad de modificación del parámetro que sería necesaria para provocar que la impedancia del fluido biológico esté en o aproximadamente en el valor de impedancia objetivo y, opcionalmente, modificar el parámetro en esa cantidad. Se apreciará que en algunos aspectos de la invención la modificación del parámetro no es opcional. Además, la modificación puede ser manual o automática. Fluidos biológicos a modo de ejemplo pueden ser plasma sanguíneo, productos intermedios de plasma fraccionado, disoluciones de proteínas, suspensiones de proteínas y/o suspensiones de cultivo celular filtradas.

En otro aspecto, se proporciona un método para preparar una suspensión de proteínas que tiene una impedancia dentro de un intervalo de referencia objetivo de valores de impedancia. Un sólido y/o una pasta de proteína pueden mezclarse con un disolvente para formar una suspensión de proteínas. La impedancia de la suspensión de proteínas puede monitorizarse antes, durante y/o después de la etapa de mezclado y la impedancia puede compararse con un intervalo de referencia objetivo de valores de impedancia y/o un único valor de impedancia de referencia objetivo. Las etapas de mezclado, monitorización y comparación pueden repetirse hasta que la impedancia esté dentro de un intervalo de referencia objetivo de valores de impedancia y/o la impedancia esté dentro de una cantidad aceptable del único valor de impedancia de referencia objetivo.

En otro aspecto, se proporciona un sistema de control de proceso para controlar la separación de una proteína de un fluido biológico en un recipiente. El sistema puede comprender un medidor de impedancia, que puede estar adaptado para medir la impedancia de un fluido biológico. El medidor de impedancia puede comprender dos o más electrodos. Los dos o más electrodos pueden comprender un primer electrodo o primer par de electrodos capaces de transmitir una señal eléctrica a través del fluido biológico y un segundo electrodo o segundo par de electrodos capaces de recibir la señal eléctrica del primer par de electrodos. El primer par de electrodos puede estar configurado para insertarse en un primer punto de acceso del recipiente y el segundo par de electrodos puede estar configurado también para insertarse en el primer punto de acceso o un segundo punto de acceso del recipiente. Adicionalmente, el sistema puede comprender además un ordenador conectado eléctricamente al medidor de impedancia. El ordenador puede estar adaptado para recuperar una medición de impedancia del fluido biológico a partir del medidor de impedancia y/o puede estar adaptado para ajustar automáticamente un parámetro que modifica la solubilidad de una proteína en el fluido biológico cuando la medición de impedancia se desvía de un valor de impedancia objetivo y/o un intervalo de impedancia de referencia objetivo en más de una tolerancia aceptable.

En aún otro aspecto, se proporciona un sistema de control de proceso para preparar una suspensión de proteínas en un reactor en un procedimiento de separación de proteínas. El sistema puede comprender un medidor de impedancia para medir una impedancia de la suspensión de proteínas. El medidor de impedancia puede comprender dos o más electrodos, incluyendo un primer par de electrodos capaz de transmitir una señal eléctrica a través de la suspensión de proteínas. El primer par de electrodos puede estar configurado para insertarse en un primer punto de acceso al reactor. El medidor de impedancia puede comprender además un segundo par de electrodos para recibir la señal eléctrica del primer electrodo. Generalmente, el segundo par de electrodos puede estar configurado para insertarse también en el primer punto de acceso al reactor o un segundo punto de acceso al reactor del reactor. El sistema puede comprender además un ordenador conectado eléctricamente al medidor de impedancia. El ordenador puede estar adaptado para recuperar una medición de impedancia de la suspensión de proteínas a partir del medidor de impedancia, y desencadenar automáticamente una etapa posterior en el procedimiento de separación de proteínas cuando la medición está dentro de un intervalo de referencia objetivo de valores de impedancia.

Otro aspecto es proporcionar un método para monitorizar un procedimiento de separación de proteínas. El método

5 puede comprender medir la impedancia de una suspensión de proteínas a una pluralidad de frecuencias para producir un espectro de impedancia medida. Este espectro de impedancia medida puede contrastarse o compararse con un espectro de impedancia conocida, o espectro de impedancia de referencia. Basándose en la comparación, puede caracterizarse al menos una propiedad física o química de la disolución de proteínas y puede hacerse una modificación en la disolución de proteínas y/o el procedimiento de separación de proteínas. Esta modificación puede decirse que está basada en la caracterización de la propiedad física o química.

10 Otro aspecto es proporcionar un método de monitorización de un procedimiento de purificación de proteínas. El método comprende medir la impedancia de una mezcla que contiene proteínas tal como una disolución o una suspensión de plasma sanguíneo a una frecuencia definida o intervalo de frecuencias y comparar la impedancia medida con una impedancia de referencia para determinar al menos una característica del procedimiento de purificación de proteínas.

15 Se expondrán características y ventajas adicionales de las realizaciones en la descripción que sigue, y en parte resultará evidente a partir de la descripción. Los objetivos y otras ventajas de la invención se realizarán y lograrán mediante el sistema y los métodos indicados particularmente en las realizaciones a modo de ejemplo en la descripción y las reivindicaciones escritas de la misma así como los dibujos adjuntos.

20 Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son a modo de ejemplo y explicativas y pretenden proporcionar una explicación adicional de la invención tal como se reivindica.

### Breve descripción de los dibujos

25 La figura 1 muestra una realización a modo de ejemplo de un sistema de control de proceso de la presente invención para controlar y/o monitorizar un procedimiento con proteínas.

La figura 2 muestra una realización a modo de ejemplo de una sonda para su uso con el sistema de control de proceso de la figura 1.

30 La figura 3 muestra un diagrama de flujo de un procedimiento de fraccionamiento de Cohn modificado a modo de ejemplo.

35 La figura 4 ilustra un gráfico de Nyquist a modo de ejemplo que muestra que la impedancia de una disolución de albúmina puede correlacionarse con el pH de la disolución.

La figura 5 ilustra un gráfico de Nyquist a modo de ejemplo que muestra que la impedancia de una disolución de albúmina puede correlacionarse con la concentración de sodio de la disolución.

40 La figura 6 ilustra un gráfico de Nyquist a modo de ejemplo que muestra que la impedancia de una pasta de fracción II+III suspendida en una concentración de alcohol del 20% puede correlacionarse con el grado de separación de proteínas en la disolución.

45 La figura 7 ilustra un gráfico de Nyquist a modo de ejemplo que muestra que la impedancia de una disolución de plasma crioempobrecido puede correlacionarse con la concentración de alcohol en el plasma.

La figura 8 ilustra un gráfico de Nyquist a modo de ejemplo que muestra que la impedancia de una pasta de fracción II+III suspendida en tampón acetato-fosfato puede correlacionarse con el envejecimiento de la suspensión.

50 La figura 9 muestra una representación gráfica a modo de ejemplo de IgG centrada frente a promedio a lo largo del tiempo para una pasta de fracción II+III que está suspendida en un tampón.

La figura 10 muestra una representación gráfica a modo de ejemplo de  $\Delta Re Z$  centrada frente a promedio a lo largo del tiempo para una pasta de fracción II+III que está suspendida en un tampón.

55 La figura 11 muestra una representación gráfica a modo de ejemplo de  $\Delta Im Z$  centrada frente a promedio a lo largo del tiempo para una pasta de fracción II+III que está suspendida en un tampón.

La figura 12 muestra una representación gráfica a modo de ejemplo de IgG centrada frente a promedio en múltiples etapas en un procedimiento de filtración y lavado posterior utilizando la fracción II+III.

60 La figura 13 muestra una representación gráfica a modo de ejemplo de  $\Delta Re Z$  centrada frente a promedio en múltiples etapas en un procedimiento de filtración y lavado posterior utilizando la fracción II+III.

65 La figura 14 muestra una representación gráfica a modo de ejemplo de  $\Delta Im Z$  centrada frente a promedio en múltiples etapas en un procedimiento de filtración y lavado posterior utilizando la fracción II+III.

La figura 15 muestra una representación gráfica a modo de ejemplo de  $\Delta Re Z$  centrada frente a promedio para una disolución de albúmina al 5% que se somete a un procedimiento de adición de alcohol.

5 La figura 16 ilustra un gráfico de Nyquist a modo de ejemplo que muestra que la impedancia de una disolución de albúmina puede correlacionarse con la concentración de alcohol de la disolución.

La figura 17 muestra una representación gráfica a modo de ejemplo de  $\Delta Re Z$  centrada frente a promedio para una disolución de albúmina al 5% que se somete a un procedimiento de adición de alcohol.

## 10 Descripción detallada

15 Todos los términos usados en el presente documento pretenden tener su significado habitual en la técnica a menos que se disponga otra cosa. Todas las concentraciones están en términos de porcentaje en volumen del componente especificado en relación con todo el volumen de la mezcla. A menos que se especifique otra cosa, el término "mezcla" puede referirse a un sólido, un líquido, una disolución, una suspensión o un coloide que comprende al menos dos sustancias. El término "mezcla de proteínas" se define como una mezcla que comprende al menos una proteína. En algunas realizaciones la "mezcla de proteínas" puede referirse a un "fluido biológico" tal como, pero sin limitarse a plasma sanguíneo, plasma reunido, mezclas de plasma, productos de plasma fraccionado, productos intermedios de plasma fraccionado, disolución o suspensión de proteínas, suspensión de cultivo celular, o cualquier combinación de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, plasma reunido puede referirse a un componente de sangre completa recogido de cualquier número de donantes y combinado. En determinadas realizaciones el plasma reunido puede recogerse de aproximadamente 200 donantes, aproximadamente 500 donantes, aproximadamente 1000 donantes, aproximadamente 2.000 donantes o aproximadamente 5.000 o más.

25 La invención proporciona en general sistemas y métodos que permiten la monitorización y/o el control en tiempo real o casi tiempo real de procedimientos con proteínas que utilizan o crean mezclas de proteínas. Tal como se usa en el presente documento, el término "procedimiento con proteínas" incluye cualquiera de varios procedimientos comerciales, tales como pero sin limitarse a procedimientos de separación de proteínas, procedimientos de purificación de proteínas, procedimientos de extracción de proteínas, procedimientos de fraccionamiento de proteínas, formulación de proteínas, producción de mezclas de proteínas, almacenamiento de mezclas de proteínas, almacenamiento de fracciones de proteínas, almacenamiento de pastas de proteínas, almacenamiento de recipientes finales de proteínas y similares.

35 Los procedimientos con proteínas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, los procedimientos con proteínas descritos en J. Am. Chem. Soc. 68:459-475 (1946), Cohn *et al.* (el "procedimiento de fraccionamiento de Cohn" o "procedimiento de Cohn"); J. Am. Chem. Soc. 71:541-550 (1949), Oncley *et al.* (el "procedimiento de fraccionamiento de Oncley" o "procedimiento de Oncley"); Vox Sang. 7:414-424 (1962), Kistler *et al.* (el "procedimiento de fraccionamiento de Kistler" o "procedimiento de Kistler"); y Vox Sang 92:42-44 (2007), Teschner *et al.* (el "procedimiento de fraccionamiento de Teschner" o "procedimiento de Teschner"). Se entenderá que los sistemas descritos en el presente documento, que usan IS para monitorizar y/o controlar procedimientos con proteínas, son útiles con cualquier número de procedimientos con proteínas y, aunque se describen varios procedimientos con proteínas a modo de ejemplo en detalle en el presente documento, la invención no se limita de ningún modo a sólo esos procedimientos con proteínas a modo de ejemplo descritos. De hecho, los sistemas descritos en el presente documento pueden ser útiles con cualquier técnica de extracción y/o purificación de proteínas que se base en alterar la solubilidad de una proteína deseada en un fluido biológico ajustando la concentración iónica, concentración de proteína, concentración de precipitante orgánico miscible con agua (por ejemplo, alcohol), pH, temperatura y/o cualquier combinación de los mismos.

50 El término "producto intermedio de plasma fraccionado" se refiere a, pero no se limita a, fracción de Cohn I, fracción de Cohn II+III, fracción de Cohn I+II+III, fracción de Cohn IV-1, fracción de Cohn IV-4 y/o fracción de Cohn V, del procedimiento de fraccionamiento de Cohn; fracción de Oncley II+IIIw, fracción de Oncley II y/o fracción de Oncley III del procedimiento de fraccionamiento de Oncley; precipitado de Kistler A, precipitado de Kistler B, precipitado de Kistler IV, precipitado de Kistler C y/o precipitado de Kistler D del procedimiento de fraccionamiento de Kistler; precipitado de Teschner G del procedimiento de fraccionamiento de Teschner; y/o cualquier combinación, modificación o variación de los mismos.

60 El término "producto de plasma fraccionado" incluye cualquier proteína o producto proteico separado del plasma sanguíneo, tal como pero sin limitarse a, albúmina, inhibidor de alfa1-proteinasas, factor antihemofílico, complejo de factor de von Willebran, complejo coagulante anti-inhibidor, antitrombina, inhibidor de esterasa C1, factores de coagulación, fibrina, fibrinógeno, inmunoglobulina, concentrado de proteína C, trombina y/o una variedad de combinaciones y variaciones de los mismos. Normalmente, un producto de plasma fraccionado puede ser suficientemente estéril para su administración a un paciente humano.

65 En determinadas realizaciones de la invención, se monitoriza, se ajusta y/o se modifica un parámetro que modifica la solubilidad de una proteína en una mezcla de proteínas que se somete a un procedimiento con proteínas. Tales parámetros pueden incluir, por ejemplo: pH, conductividad, separación líquido/sólido, concentración de precipitante

orgánico miscible con agua, agregación de proteínas, densidad, velocidad de flujo, viscosidad, concentración de proteínas, temperatura y/o envejecimiento de proteínas de mezclas.

5 Generalmente, la invención se refiere a la monitorización y/o el control de procedimientos con proteínas usando mediciones de impedancia de una mezcla de proteínas utilizada o preparada mediante los procedimientos. La presente invención permite que una mezcla de proteínas se caracterice en cualquier fase de un procedimiento con proteínas sin la medición directa de propiedades específicas. En su lugar, puede medirse la impedancia de una mezcla de proteínas durante el procedimiento con proteínas, en tiempo real o casi tiempo real, y estas mediciones de impedancia pueden usarse para determinar indirectamente propiedades o parámetros de la mezcla o el procedimiento sobre el que se desea información. Usando la información obtenida, el procedimiento o la mezcla pueden ajustarse. Los sistemas y métodos divulgados, por tanto, pueden mejorar las capacidades de control de proceso, facilitar ajustes de proceso oportunos y/o pueden ayudar en la preparación de producto que tiene calidad constante al permitir a un profesional acceder a información en tiempo real o casi tiempo real sobre propiedades de mezclas que contienen proteínas, sin la necesidad de procedimientos de preparación de muestras u otros procedimientos que requieren mucho tiempo. Por “casi tiempo real” quiere decirse que el procedimiento puede monitorizarse y/o ajustarse dentro de un marco temporal tal que las propiedades del procedimiento no han cambiado en una cantidad medible y/o significativa. Por ejemplo, “casi tiempo real” puede ser en el plazo de 1 segundo, 5 segundos, 10 segundos, 20 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos o 15 minutos, dependiendo del procedimiento con proteínas y/o la mezcla de proteínas. Preferiblemente “casi tiempo real” puede ser en el plazo de 1 segundo, 5 segundos, 10 segundos, 20 segundos, 30 segundos o 1 minuto.

Las realizaciones a modo de ejemplo descritas en el presente documento utilizan IS para una monitorización y/o control en proceso rápida y fiable de parámetros de procedimiento con proteínas durante procedimientos con proteínas tales como: procedimientos de preparación de disoluciones de proteínas, procedimientos de extracción de proteínas, procedimientos de purificación de proteínas y/o procedimientos de almacenamiento de fracciones de proteínas. En determinadas realizaciones puede obtenerse cualquier número de mediciones de la impedancia compleja de una mezcla que contiene proteínas implicada en un procedimiento con proteínas, por ejemplo, usando una sonda eléctrica en contacto eléctrico con la mezcla de proteínas. Tales mediciones de impedancia pueden usarse para determinar un parámetro o estado de la mezcla en cualquier etapa de un procedimiento con proteínas mediante la comparación con un valor de impedancia de referencia o intervalo de referencia de valores de impedancia. El valor de impedancia de referencia o intervalo de referencia de valores de impedancia pueden medirse o determinarse previamente para una mezcla de proteínas sustancialmente similar durante un procedimiento con proteínas sustancialmente similar.

35 En determinadas realizaciones, si el valor de impedancia medido está dentro de una tolerancia aceptable del valor de impedancia de referencia o intervalo de referencia de valores de impedancia, se permite que el procedimiento con proteínas continúe sin ajuste o modificación. Sin embargo, si el valor de impedancia medido se desvía del valor de impedancia de referencia o intervalo de referencia de valores de impedancia en más de una tolerancia aceptable, puede hacerse un ajuste en el procedimiento con proteínas y/o la mezcla de proteínas.

40 Se entenderá que la tolerancia aceptable dependerá de cualquier número de parámetros incluyendo pero sin limitarse al procedimiento con proteínas particular o la etapa dentro del procedimiento, la mezcla de proteínas específica, el producto final deseado y similares. Además, la tolerancia aceptable variará dependiendo de la correlación entre valores de impedancia de la mezcla de proteínas con características fisicoquímicas de la mezcla de proteínas. En algunas realizaciones a modo de ejemplo, la tolerancia aceptable puede ser de aproximadamente un 0,001% hasta aproximadamente un 10%, de aproximadamente un 0,01% hasta aproximadamente un 5%, o de aproximadamente un 0,1% hasta aproximadamente un 1% de diferencia entre el valor de impedancia medido y el valor de impedancia de referencia. En determinadas realizaciones, la tolerancia aceptable puede ser menor de o igual al 0,5%, el 1%, el 1,5%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5%, el 6%, el 7%, el 8%, el 9% o el 10% de los valores de impedancia de referencia. En otras realizaciones, la tolerancia aceptable puede estar en o dentro de una desviación estándar, dos desviaciones estándar o dentro de un error estándar de los datos empíricos usados para obtener los valores de impedancia de referencia.

55 En otras realizaciones, la impedancia de una mezcla de proteínas puede determinarse en tiempo real o casi tiempo real durante cualquier duración razonable incluyendo a lo largo de cada etapa de procedimiento de un procedimiento con proteínas que usa la mezcla de proteínas. Si en cualquier momento durante el procedimiento con proteínas se determina que el valor de impedancia medido está fuera de un intervalo deseado u “objetivo” de valores de impedancia de referencia, puede efectuarse un cambio o ajuste en la mezcla de proteínas o procedimiento con proteínas. En algunas realizaciones, el cambio o ajuste puede ser automático y/o estar informatizado, mientras que en otras el cambio o ajuste puede ser manual. En otras realizaciones, la medición de la impedancia de la mezcla, la comparación del valor de impedancia medido con un intervalo de referencia de valores de impedancia y la realización de un cambio o ajuste en el procedimiento o mezcla de proteínas pueden continuarse o repetirse según se desee o se requiera hasta que la impedancia medida está dentro del intervalo objetivo de valores de impedancia de referencia.

65 En una realización a modo de ejemplo, puede hacerse un cambio o ajuste en un parámetro que modifica la

solubilidad de una proteína en la mezcla de proteínas. Un parámetro que modifica una proteína en una mezcla de proteínas puede ser, por ejemplo: concentración de solutos, concentración de disolvente, pH, fuerza iónica y/o temperatura. Se apreciará que hay varios métodos para cambiar o modificar un parámetro de este tipo o una combinación de parámetros de una mezcla de proteínas, tales como, por ejemplo: la adición de componentes tales como sales, alcoholes, agua, ácidos y/o bases a la mezcla de proteínas; la eliminación de componentes de la mezcla de proteínas mediante, por ejemplo, filtración o similares; el calentamiento y/o enfriamiento de la mezcla de proteínas; y/o la exposición de la mezcla de proteínas a fuentes externas de energía.

En otra realización a modo de ejemplo, el valor de impedancia de referencia objetivo o deseado o intervalo objetivo de valores de impedancia de referencia puede correlacionarse con cualquier número de propiedades físicas y/o químicas de una mezcla de proteínas. La impedancia de una suspensión de proteínas puede determinarse en muchas fases de un procedimiento con proteínas, tal como un procedimiento de extracción, separación o purificación de proteínas, que usa la suspensión de proteínas. Correlacionando los valores de impedancia medidos con una característica, tal como, por ejemplo: concentración de proteína, concentración de sal, grado de degradación de proteínas (por ejemplo, actividad de degradación de la proteína incluyendo pero sin limitarse a: actividad de unión, actividad enzimática, actividad de antígeno / anticuerpo, etc.), envejecimiento de proteínas y/o grado de separación de proteínas, cada medición de impedancia permitirá una aproximación de esa característica. De este modo, puede obtenerse información sobre el procedimiento y pueden efectuarse cambios en el procedimiento basándose en la información.

Aunque se describe como un valor de impedancia medido, se apreciará que puede obtenerse cualquier número de valores de impedancia medidos a partir de una mezcla de proteínas según se desee o se requiera para determinar la impedancia de una mezcla de proteínas hasta un determinado grado de certeza. Las mediciones pueden tomarse a cualquier intervalo de tiempo hasta, e incluyendo, mediciones continuas. Además, la impedancia de una mezcla de proteínas, tal como pero sin limitarse a un precipitado proteico, puede determinarse en múltiples ubicaciones dentro de la mezcla de proteínas para garantizar la homogeneidad. Esto es importante en procedimientos de fabricación a gran escala en donde la homogeneidad de una disolución o precipitado es más difícil de obtener. Además, durante un procedimiento con proteínas individual, pueden tomarse mediciones de impedancia *in situ* o *ex situ* en cualquier número de etapas de principio a fin. De este modo, pueden determinarse valores de impedancia medidos por todo un lote o serie completa de una mezcla de proteínas, en vez de, por ejemplo, medir una muestra tomada del lote. Sin embargo, si se desea, puede medirse la impedancia de una muestra.

En referencia a la figura 1, se muestra un sistema 100 de control de proceso a modo de ejemplo en el que puede medirse la impedancia de una mezcla de proteínas, tal como un fluido biológico, contenido dentro de un reactor o recipiente 150 a una o más frecuencias durante un procedimiento con proteínas. Tal como se muestra, el sistema 100 de control incluye en general un medidor 110 de impedancia que tiene una sonda 120 unida al mismo mediante cualquier medio 130 conductor, tal como cables aislados o similares. En otra realización, el sistema 100 de control puede incluir un par de sondas 120 unidas al medidor 110 de impedancia. Aunque sólo se muestra una sonda 120, se apreciará que puede unirse cualquier número de sondas 120 al medidor 110 de impedancia, incluyendo pero sin limitarse a 2, 3, 4, 5, 10, 15 ó 20 sondas, y tales pueden ubicarse por todo el reactor o recipiente 150.

En determinadas realizaciones, el medidor 110 de impedancia puede ser cualquier instrumento electrónico que es capaz de emitir señales eléctricas y recibir señales eléctricas. El medidor 110 de impedancia puede generar una señal eléctrica a un determinado voltaje, corriente y/o frecuencia a través de una sonda 120 unida que puede estar dispuesta en una mezcla de proteínas en el reactor o recipiente 150. La sonda 120 puede estar adaptada para insertarse en un punto 160 de acceso al reactor del reactor o recipiente 150 de manera que la sonda 120 está en contacto eléctrico directo o indirecto con el fluido biológico contenido en el mismo. De nuevo, aunque sólo se muestra un único punto 160 de acceso al reactor, se apreciará que puede estar presente cualquier número de puntos 160 de acceso al reactor en el reactor o recipiente 150, tal como pero sin limitarse a 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 ó 25 puntos 160 de acceso. Además, puede insertarse una única sonda 120 en un único punto 160 de acceso al reactor. Alternativamente, pueden insertarse un par de sondas 120 o múltiples 120 en un único punto 160 de acceso al reactor.

Generalmente, el medidor 110 de impedancia puede tener la capacidad de producir y transmitir una señal eléctrica sinusoidal de una frecuencia de entre aproximadamente 20 Hz y aproximadamente 20 MHz. En una realización preferida, la señal eléctrica generada puede ser de aproximadamente 0,02 kHz hasta aproximadamente 843 kHz. En otra realización, la señal eléctrica generada puede ser de aproximadamente 0,05 kHz hasta aproximadamente 0,1 kHz. El medidor 110 de impedancia puede tener además la capacidad de producir y transmitir una señal eléctrica de CA de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 mV, incluyendo todos y cada uno de los valores entre estos, sin embargo, la señal eléctrica empleada debe provocar sólo una perturbación mínima de la mezcla para producir una respuesta de corriente pseudolineal. El medidor 110 de impedancia puede recibir adicionalmente una señal eléctrica una vez que se ha propagado a través de la mezcla por medio de la sonda 120 unida.

En determinadas realizaciones, el medidor 110 de impedancia es capaz de medir la inductancia, capacitancia, resistencia y/o las componentes reales e imaginarias de la impedancia (explicado adicionalmente a continuación) de una mezcla de proteínas detectando diferencias en la señal eléctrica transmitida al fluido biológico en el reactor o

recipiente 150 y la señal recibida o resultante tras haberse propagado la señal eléctrica a través del fluido biológico. En una realización a modo de ejemplo, el medidor 110 de impedancia puede ser un medidor de LCR de precisión E4980A de Agilent Technologies. En otra realización a modo de ejemplo, el medidor 110 de impedancia puede ser un medidor de LCR de precisión 4989 de Agilent.

5 Tal como se muestra, el medidor 110 de impedancia puede estar conectado de manera controlable y/o eléctrica a un ordenador 140 que tiene memoria para almacenar y procesar datos recibidos desde el medidor 110 de impedancia. El ordenador 140 puede estar conectado al medidor 110 de impedancia mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo tanto conexiones alámbricas como conexiones inalámbricas a lo largo de una red. Aunque no se muestra, el ordenador puede estar conectado a cualquiera de varios dispositivos periféricos conocidos incluyendo, por ejemplo, un teclado, un ratón, un dispositivo de presentación visual, una pantalla táctil, una impresora y/o cualquier otro equipo para facilitar la entrada y/o salida del usuario. Alternativamente, se contempla que el ordenador 140 y el medidor 110 de impedancia puedan integrarse en un único dispositivo.

15 En una realización a modo de ejemplo, el ordenador 140 está adaptado para recuperar una medición de impedancia de una mezcla de proteínas a partir de un medidor 110 de impedancia que tiene una sonda 120 dispuesta en la mezcla de proteínas. El ordenador puede estar adaptado para controlar el medidor 110 de impedancia tal como, por ejemplo, la salida de una señal eléctrica.

20 En otra realización a modo de ejemplo, el ordenador 140 puede estar adaptado para analizar y/o ajustar un parámetro de una mezcla de proteínas en el reactor o recipiente 150. El parámetro puede modificar la solubilidad de una proteína en la mezcla de proteínas de manera que la proteína puede precipitarse de la mezcla de proteínas. Por ejemplo, el ordenador 140 puede estar conectado de manera controlable a equipo de procedimiento mecánico o eléctrico adicional (no mostrado) que también puede estar conectado al reactor o recipiente 150. El equipo de procedimiento a modo de ejemplo incluye pero no se limita a equipos tales como: bombas, válvulas, equipos de calentamiento o enfriamiento, mezcladoras, recipientes y similares. De este modo, el ordenador 140 puede estar adaptado para controlar el equipo de procedimiento que puede ajustar parámetros de procedimiento tales como la velocidad de adición de un aditivo o la elevación o disminución de la temperatura. Aunque no se muestra, el ordenador 140 puede estar conectado además a un sistema de aviso tal como un sistema de alarma auditiva y/o un sistema de alerta visual.

En determinadas realizaciones, el ordenador 140 puede estar adaptado para ajustar un parámetro que modifica la solubilidad de una proteína en una mezcla de proteínas cuando la impedancia medida de una mezcla de proteínas se desvía de un valor de impedancia de referencia objetivo o intervalo objetivo de valores de impedancia de referencia en más de una tolerancia aceptable. En una realización, el valor de impedancia de referencia objetivo o intervalo objetivo de valores de impedancia de referencia puede almacenarse en, por ejemplo, una base de datos a la que puede acceder el ordenador 140. El ordenador 140 puede comparar entonces valores de impedancia medidos recibidos y/o almacenados desde un medidor 110 de impedancia con valores de impedancia de referencia almacenados (es decir, valores de impedancia de referencia objetivo e intervalos objetivo de valores de impedancia de referencia). Generalmente, la tolerancia aceptable puede introducirla un usuario o determinarla el ordenador 140 basándose en la información sobre un procedimiento, mezcla o producto deseado particular (por ejemplo, datos obtenidos de procedimientos de producción previos, parámetros de procedimientos de funcionamiento convencionales para cualquier procedimiento, mezcla o producto deseado particular, etc.). El ordenador 140 puede estar adaptado además para avisar automáticamente a un operario cuando la impedancia medida de una mezcla de proteínas se desvía de un valor de impedancia de referencia objetivo o intervalo objetivo de valores de impedancia de referencia en más de una tolerancia aceptable.

Aunque descrita como un reactor o recipiente 150, se entenderá que la presente invención no está limitada de ese modo y se contempla que cualquier equipo que pueda contener y/o transferir una mezcla de proteínas durante una cantidad de tiempo deseada es compatible con la presente invención. Por tanto, el reactor o recipiente 150 puede ser cualquier elemento de equipo tal como, por ejemplo: una o más calderas, cubas, tanques, botellas, bolsas, filtros, centrifugas, piletas y/o cualquier otro recipiente compatible. En una realización específica, el reactor o recipiente 150 puede ser una línea de transferencia que contiene la mezcla de proteínas y la línea de transferencia puede estar hecha de un material tal como, por ejemplo, acero inoxidable, vidrio o plástico. En otra realización, el reactor o recipiente 150 puede ser una columna de cromatografía tal como, pero sin limitarse a, una columna de filtración en gel, intercambio iónico o inmunoafinidad. En aún otra realización a modo de ejemplo, el reactor o recipiente 150 puede ser una columna de cromatografía que tiene, por ejemplo, una configuración de lecho expandido o empaquetado. En otras realizaciones a modo de ejemplo, el reactor o recipiente 150 puede ser: un reactor discontinuo, un reactor semicontinuo, un reactor de tanque agitado continuo (CSTR), un reactor tubular, un reactor de lecho fijo o un reactor de lecho fluidizado.

Se entenderá que el reactor o recipiente 150 puede estar ubicado dentro de una sala de procesamiento, o puede estar conectado a la sala de procesamiento mediante, por ejemplo, tuberías revestidas de vidrio o acero inoxidable aisladas. Además, en algunas realizaciones, se colocan serpentes de enfriamiento y/o calentamiento (no mostrados) adyacentes a, o rodeando al reactor o caldera 150 de sistemas a modo de ejemplo con el fin de aumentar la velocidad a la que puede disminuirse la temperatura.

En referencia a la figura 2, se muestra una realización a modo de ejemplo de una sonda 200. La sonda 200 puede estar conectada a un medidor de impedancia a través de cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a: cables, cables aislados, tecnología inalámbrica, accesorios, abrazaderas, tornillos, pinzas, adhesivos y similares. En una realización, la sonda 200 comprende al menos un electrodo 210 de transmisión y al menos un electrodo 220 de recepción. El al menos un electrodo 210 de transmisión puede estar conectado eléctricamente a un medidor de impedancia y adaptado de manera que pueda propagarse una señal eléctrica, o señal de excitación, desde el medidor de impedancia hasta el al menos un electrodo 210 de transmisión. La señal eléctrica puede fluir desde el al menos un electrodo 210 de transmisión en contacto con, sumergido o dispuesto en una mezcla de proteínas, a través de la mezcla, y puede recibirse por al menos un electrodo 220 de recepción, que también puede estar en contacto con, sumergido o dispuesto en la mezcla. El al menos un electrodo 220 de recepción puede estar adaptado para recibir un señal eléctrica, y puede estar conectado eléctricamente a un medidor de impedancia de manera que una señal eléctrica pueda transmitirse desde el al menos un electrodo 220 de recepción hasta el medidor de impedancia 210. Generalmente, el al menos un electrodo 210 de transmisión puede aislarse con respecto del al menos un electrodo 220 de recepción para impedir que los electrodos entren en contacto entre sí. Una sonda 200 a modo de ejemplo es un sensor de conductividad esterilizable modelo TB457 de ABB. En una realización a modo de ejemplo, el al menos un electrodo 210 de transmisión comprende un par de electrodos y el al menos un electrodo 220 de recepción también comprende un par de electrodos.

Se apreciará que una única sonda 200 puede comprender un par de electrodos, o cualquier número de electrodos de transmisión 210 o de recepción 220 y, aunque caracterizado como electrodo 210 de transmisión y electrodo 220 de recepción, cualquier electrodo puede estar adaptado para ser un electrodo de recepción, un electrodo de transmisión o un electrodo tanto de recepción como de transmisión dependiendo de la polaridad. Además, se apreciará que puede emplearse cualquier número de sondas 200 para medir las propiedades electroquímicas y eléctricas de una mezcla, tal como pero sin limitarse a impedancia. Además, cada sonda 200 puede ser capaz de emitir señales eléctricas a diferentes frecuencias o a la misma frecuencia de cualquier otra sonda 200.

En una realización a modo de ejemplo, una única sonda 200 puede sumergirse en una mezcla de proteínas, tal como, por ejemplo, un plasma sanguíneo y la impedancia del plasma puede medirse durante un procedimiento de purificación o separación de proteínas. En otro ejemplo, dos o más sondas 200 pueden sumergirse en múltiples ubicaciones dentro de un fluido biológico, tal como pero sin limitarse a una disolución de albúmina, y las mediciones de impedancia pueden tomarse en cada ubicación a la misma frecuencia de excitación. En aún otro ejemplo, puede usarse una única sonda 200 para medir la impedancia de una suspensión de proteínas que tiene una concentración de proteína, por ejemplo, concentración de IgG, a múltiples frecuencias y en tiempo real.

#### Espectroscopía de impedancia

En un aspecto, la monitorización y/o el control de procedimientos con proteínas pueden utilizar cualquier método y dispositivo adecuados para medir la impedancia de una mezcla de proteínas. En una realización a modo de ejemplo, puede aplicarse una señal eléctrica sinusoidal o señal de excitación a cualquier líquido, tal como, por ejemplo, una disolución o suspensión de proteínas. La señal puede oscilar generalmente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 mV de manera que la medición de la impedancia provoca sólo una perturbación mínima del sistema. Tal como se muestra en la ecuación 1, una señal de excitación a modo de ejemplo tiene un potencial dependiente del tiempo,  $E(t)$ , una amplitud,  $E_0$ , y una frecuencia,  $\omega$ . La frecuencia radical,  $\omega$ , es igual a  $2\pi$  multiplicado por  $f$ , la frecuencia en hercios, es decir,  $\omega=2\pi f$ .

#### *Ecuación 1*

$$E(t) = E_0 \sin(\omega t)$$

Una vez que la señal de excitación se propaga a través de la mezcla de proteínas, puede medirse la corriente resultante para determinar la impedancia de la mezcla. Tal como se muestra en la ecuación 2, la corriente medida,  $I(t)$ , puede aproximarse a una onda sinusoidal a la misma frecuencia que la señal de excitación, pero desplazada en la fase.

#### *Ecuación 2*

$$I(t) = I_0 \sin(\omega t + \phi)$$

en donde  $I(t)$  es la corriente a tiempo  $t$ , con amplitud  $I_0$  y desplazada en la fase en  $\phi$ .

Puede usarse la ley de Ohm (ecuación 3) para expresar la impedancia de la mezcla en un momento particular en función de una magnitud  $Z_0$ , frecuencia ( $\omega$ ) y un desplazamiento de fase ( $\phi$ ).

## Ecuación 3

$$Z_t = \frac{E_t}{I_t} = \frac{E_0 \sin(\omega t)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)} = Z_0 \frac{\sin(\omega t)}{\sin(\omega t + \phi)}$$

5 Adicionalmente, la impedancia también puede representarse en espacio de frecuencia como un número complejo que tiene una parte real (representativa de la resistencia) y una parte imaginaria (representativa de la reactancia), tal como se muestra en la ecuación 4.

## Ecuación 4

10

$$Z_\omega = \frac{E}{I} = Z_0 e^{j\phi} = Z_0 (\cos \phi + j \sin \phi)$$

Por tanto, la impedancia compleja variará con la frecuencia de la señal de excitación aplicada.

15 Debido a que la impedancia compleja está representada por una componente real y una componente imaginaria, cualquiera de estas componentes puede determinarse a partir de una medición de impedancia compleja de una mezcla de proteínas. Además, dependiendo de una mezcla de proteínas particular que está midiéndose, o bien la componente real o bien la componente imaginaria pueden correlacionarse más fuertemente con una propiedad, un parámetro o un estado de la mezcla de proteínas que la otra. Por tanto, en una realización, o bien la componente real o bien la imaginaria de la impedancia puede compararse independientemente con un valor de impedancia de referencia para determinar información sobre la mezcla de proteínas o el procedimiento con proteínas.

20

Se apreciará además que las componentes reales e imaginarias de una impedancia medida pueden correlacionarse fuertemente con las propiedades de una mezcla de proteínas a la misma frecuencia o a frecuencias diferentes. Por ejemplo, la componente real de la impedancia de una suspensión de proteínas puede correlacionarse fuertemente con una mezcla de proteínas particular o un estado de una mezcla de proteínas a una frecuencia de aproximadamente 1,6 kHz hasta aproximadamente 16 kHz, mientras que la componente imaginaria de la impedancia de la misma mezcla de proteínas puede correlacionarse fuertemente con la mezcla de proteínas o el estado de la mezcla de proteínas a una frecuencia de aproximadamente 16 kHz hasta aproximadamente 50 kHz.

25

Mientras tanto, en algunas realizaciones, sólo la componente real o imaginaria de la impedancia puede determinarse y compararse con un valor de impedancia de referencia, en otras realizaciones, la impedancia compleja, que incluye las componentes tanto real como imaginaria, puede medirse y compararse con un valor de impedancia de referencia objetivo o intervalo de valores de impedancia de referencia objetivo.

30

35

#### Generación de una curva de referencia

Una vez medida la impedancia de una mezcla de proteínas, el valor de impedancia medido puede compararse con un valor de impedancia de referencia o intervalo de valores de impedancia de referencia. En particular, el valor de impedancia de referencia o intervalo de valores de impedancia de referencia puede representar valores objetivo para cualquier etapa en un procedimiento con proteínas tal como un procedimiento de separación, extracción o fraccionamiento. El valor de impedancia de referencia puede denominarse "valor de impedancia objetivo" o "valor de impedancia de referencia objetivo", ya que cualquier mezcla de proteínas posterior que se desea que tenga una composición sustancialmente similar con la mezcla de referencia en la etapa particular en el procedimiento con proteínas debe tener una impedancia sustancialmente similar si otras variables permanecen invariables.

40

45

En una realización a modo de ejemplo, los valores de impedancia de referencia o intervalo de valores de impedancia de referencia pueden determinarse o establecerse por medio de mediciones preliminares y la correlación de la impedancia de una mezcla de proteínas de referencia sometida a un procedimiento de referencia con proteínas. Tanto la mezcla de proteínas de referencia como el procedimiento con proteínas de referencia pueden ser sustancialmente similares a la mezcla de proteínas que no es de referencia posterior y los procedimientos con proteínas que no son de referencia sobre los que se desea información de manera que la correlación será precisa.

50

Por ejemplo, la impedancia de una mezcla de proteínas de referencia que tienen características físicas y químicas conocidas puede medirse y registrarse antes de que la mezcla se someta a un procedimiento con proteínas de referencia. La impedancia de cualquier mezcla de proteínas que no sea de referencia, posterior puede compararse con este valor de impedancia de referencia para determinar si la mezcla que no es de referencia es sustancialmente similar a la mezcla de referencia y, por tanto, adecuada para un procedimiento con proteínas particular.

55

En otro ejemplo, puede llevarse a cabo una primera etapa de un procedimiento con proteínas de referencia en la mezcla de proteínas de referencia y la impedancia puede medirse y registrarse a lo largo de toda la primera etapa para obtener un valor de impedancia de referencia y/o un intervalo de valores de impedancia de referencia que corresponden a la primera etapa del procedimiento de referencia. Durante esta primera etapa del procedimiento de referencia, una o más características físicas o químicas de la mezcla de referencia pueden ajustarse y medirse cuidadosamente además del registro de la impedancia. Usando análisis de regresión compleja lineal y/o no lineal u otras técnicas matemáticas, la impedancia de la mezcla de referencia puede correlacionarse con las características específicas, medidas de la mezcla de proteínas durante la primera etapa del procedimiento. Por consiguiente, la impedancia de una mezcla de proteínas que no es de referencia sustancialmente similar que se somete a un procedimiento que no es de referencia sustancialmente similar debe ser sustancialmente similar al valor de impedancia de referencia o intervalo de valores obtenidos. El valor de impedancia de referencia o intervalo de valores de impedancia de referencia puede denominarse, por tanto, "valor de impedancia de referencia objetivo", "valor de impedancia objetivo" o "intervalo de referencia objetivo de valores de impedancia".

Se apreciará que este procedimiento de obtención de valores de impedancia de referencia puede repetirse según se desee o se requiera para obtener valores de impedancia de referencia para múltiples etapas en un procedimiento con proteínas de referencia. Asimismo, este procedimiento puede repetirse para cualquier número de mezclas de proteínas. Además, tanto los valores de impedancia de referencia como las características de mezclas de proteínas medidas pueden registrarse en, por ejemplo, una base de datos. De este modo, es posible obtener cualquier espectro deseado de valores de impedancia de referencia basándose en las características de una mezcla de proteínas y/o una etapa particular en un procedimiento con proteínas.

En una realización más preferida, pueden determinarse valores de impedancia de referencia o un intervalo de valores de impedancia de referencia por medio de correlación y extrapolación, en vez de medición real de cada punto de datos. Por ejemplo, puede medirse un número diferenciado de valores de impedancia de referencia para una mezcla de proteínas que tiene parámetros conocidos. Generalmente, uno o más parámetros de la mezcla de proteínas pueden ajustarse a otro valor conocido, y pueden establecerse mediciones de impedancia adicionales. Usando técnicas analíticas tales como análisis de regresión lineal y/o no lineal, puede correlacionarse la parte real y/o imaginaria de la impedancia de la mezcla de proteínas con el parámetro o parámetros ajustados. De este modo, puede determinarse una ecuación de regresión, en la que la ecuación de regresión puede usarse para predecir puntos de datos adicionales. Se entenderá que tal correlación y extrapolación pueden calcularse de cualquier número de modos conocidos en la técnica, y tales cálculos pueden llevarse a cabo mediante software estadístico en un ordenador unido a un medidor de impedancia o en algunas realizaciones, incluso en el propio medidor de impedancia.

En otra realización a modo de ejemplo, el procedimiento con proteínas de referencia puede alterarse deliberadamente para obtener un valor de impedancia de referencia permisible máximo o mínimo o limitar el intervalo de valores de impedancia permisibles. Por ejemplo, si un procedimiento con proteínas particular requiere la adición de etanol a la mezcla de proteínas de manera que la concentración resultante de la mezcla de proteínas es etanol al 20% en volumen, pueden obtenerse valores de impedancia de referencia para un procedimiento con proteínas de referencia por lo demás idéntico que difiere sólo en la producción de una mezcla de proteínas al 15% o al 25% en volumen. De este modo, un profesional sería capaz de comparar un valor de impedancia medido con un intervalo de valores de impedancia de referencia para determinar si el contenido en alcohol de la mezcla de proteínas que no es de referencia es de entre el 15% y el 25%.

Se entenderá que los valores de impedancia de referencia pueden medirse, determinarse o calcularse a cualquiera de varias frecuencias de excitación diferentes. Tal como se comentó anteriormente, dependiendo de la mezcla de proteínas específica, una frecuencia de una señal eléctrica propagada a través de una proteína puede correlacionarse más fuertemente con la componente real de la impedancia o la componente imaginaria de la impedancia. Por tanto, determinando la impedancia a múltiples frecuencias, puede obtenerse información adicional de manera que puede emplearse software estadístico para establecer el intervalo de frecuencias óptimo para su uso, en donde la correlación entre las componentes real y/o imaginaria de la impedancia medida y las características de una mezcla de proteínas particular es la más fuerte. En algunas realizaciones, la frecuencia, el valor de impedancia, la composición de la mezcla de proteínas, los parámetros de la mezcla de proteínas y/o el tiempo pueden registrarse todos en una base de datos.

Aún en otra realización, la impedancia real y/o imaginaria de una mezcla de proteínas de referencia puede medirse a una única frecuencia y correlacionarse con un parámetro particular que modifica la solubilidad de una proteína en una mezcla de proteínas que se somete a un procedimiento con proteínas, tal como pero sin limitarse a: pH, conductividad, separación líquido/sólido, concentración de precipitante orgánico miscible con agua, agregación de proteínas, densidad, caudal, viscosidad, concentración de proteína, temperatura y/o envejecimiento de proteínas. Por ejemplo, la parte real de la impedancia de una mezcla de proteínas de referencia que tiene una concentración de alcohol conocida puede medirse a una frecuencia de excitación de 0,02 kHz y puede aproximarse una correlación de la concentración de alcohol con la impedancia para esta frecuencia. La concentración de alcohol de la mezcla puede ajustarse entonces y puede determinarse una concentración de alcohol aproximada usando la correlación previamente calculada. La exactitud de la correlación puede determinarse entonces comparando la concentración de

alcohol aproximada con la concentración conocida o medida.

Una vez medido, establecido, almacenado, conocido y/o hecho accesible un valor de impedancia de referencia o un intervalo de valor de impedancia de referencia, pueden compararse con el mismo valores de impedancia medidos de mezclas de proteínas. En una realización, la impedancia de una mezcla puede determinarse a intervalos de tiempo predeterminados y cada medición de impedancia puede compararse con un valor de impedancia de referencia que se tomó al mismo intervalo de tiempo en un procedimiento con proteínas de referencia. Si el valor de impedancia medido está dentro de una desviación aceptable del valor de impedancia de referencia, se permite que el procedimiento con proteínas continúe sin modificación. Sin embargo, si el valor de impedancia medido está fuera del intervalo de valores de impedancia aceptables, puede hacerse un ajuste en el procedimiento o directamente en la mezcla de proteínas. Alternativa o adicionalmente, puede notificarse a un operario la desviación.

#### Procedimientos con proteínas a modo de ejemplo

La descripción no se limita necesariamente a ningún procedimiento particular para separar y/o purificar una proteína de un fluido biológico. De hecho, se contempla que pueda controlarse, ajustarse y/o monitorizarse cualquier procedimiento para separar y/o purificar una proteína de un fluido biológico usando el sistema de control de procesos de la presente descripción, que utiliza IS como un medio para medir cualquier tipo adecuado de cambios en el procedimiento. Puede usarse IS para medir las composiciones y monitorizar el progreso de cualquier etapa de cualquier procedimiento con proteínas adecuado, tales como, por ejemplo, un procedimiento de fraccionamiento de Cohn, un procedimiento de Kistler, un procedimiento de Oncley o modificaciones de los mismos. Se describen procedimientos particularmente adecuados en la patente estadounidense 5.177.194. En una realización preferida, el sistema de control de procesos descrito en el presente documento puede usarse para controlar, ajustar y/o monitorizar cualquier etapa en un procedimiento de fraccionamiento de plasma para la producción de un producto proteico fraccionado purificado para su administración a humanos. Generalmente, la impedancia de mezclas de plasma puede medirse a lo largo de cada etapa del procedimiento de fraccionamiento y/o purificación a una frecuencia o múltiples frecuencias, y los valores de impedancia medidos pueden compararse de manera continua con valores de impedancia de referencia objetivo o intervalos de valores de impedancia de referencia objetivo para determinar si los valores de impedancia medidos están dentro de una tolerancia aceptable (es decir para determinar si el procedimiento avanza correctamente).

En algunas realizaciones, una etapa de procedimiento puede requerir sólo que se cambie una única variable de la mezcla de plasma (es decir, concentración de alcohol) mientras que otras variables se mantienen constantes. En esta realización particular, la impedancia puede medirse y compararse con un valor de impedancia de referencia o intervalo de valores de impedancia de referencia para determinar los resultados de la etapa de procedimiento (es decir, la concentración de alcohol resultante en la mezcla de plasma). En otras realizaciones, una etapa de procedimiento puede requerir que se ajusten múltiples variables (es decir concentración de alcohol, pH y temperatura), de modo que la impedancia puede no usarse para determinar el valor real de un único parámetro del plasma resultante. Más bien, la impedancia puede medirse para obtener un valor de impedancia medido, y el valor de impedancia medido puede compararse con un valor de impedancia de referencia objetivo o intervalo objetivo de valores de impedancia de referencia para determinar si el procedimiento avanza según el plan de procedimiento. Tal como se describió en detalle anteriormente, si un valor de impedancia medido está dentro de una tolerancia aceptable de un valor de impedancia de referencia objetivo, el procedimiento puede avanzar a una etapa posterior o bien automáticamente o bien a través de la notificación de un operario que puede controlar manualmente el procedimiento. Adicionalmente, si el valor de impedancia medido se desvía de un valor de impedancia objetivo o intervalo objetivo de valores de impedancia de referencia en más de una tolerancia aceptable, el procedimiento puede ajustarse automáticamente, o puede notificarse a un operario de modo que ajusta manualmente el procedimiento o la mezcla utilizada por el procedimiento.

#### Método para monitorizar y/o controlar un procedimiento de fraccionamiento de Cohn

En una realización a modo de ejemplo, el procedimiento de fraccionamiento de plasma puede ser un procedimiento de fraccionamiento de Cohn o cualquier variante del mismo. Por ejemplo, el sistema de control de procesos de la presente invención, tal como, pero sin limitarse a, las realizaciones a modo de ejemplo mostradas en las figuras 1 y 2 puede usarse para controlar, ajustar y/o monitorizar la preparación de cualquier producto intermedio de plasma proteico a partir de un procedimiento de fraccionamiento de Cohn, o cualquier variante del mismo. En una realización específica, puede usarse IS para monitorizar la producción de crioprecipitado, fracción I, fracción II+III, fracción IV-1, fracción IV-4 y/o fracción V de un procedimiento de fraccionamiento de Cohn o cualquier variante, modificación y/o combinación de los mismos.

En referencia a la figura 3, se muestra una variante a modo de ejemplo de un procedimiento de fraccionamiento de Cohn, en el que puede combinarse plasma nuevo y/o descongelado para formar una reserva de plasma. En el procedimiento a modo de ejemplo mostrado, el fraccionamiento comienza con una etapa de aislamiento de crioprecipitado que puede monitorizarse y/o controlarse usando IS. Una vez retirado el crioprecipitado de la reserva de plasma, la mezcla de proteínas restante puede denominarse plasma crioempobrecido.

Fracción I

La siguiente etapa en el procedimiento a modo de ejemplo es aislar la fracción I, que contiene normalmente fibrinógeno. Con el fin de precipitar la fracción I del plasma crioempobrecido, la mezcla de plasma se agita suavemente y se lleva hasta una temperatura de aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 2°C. La impedancia de la mezcla de plasma puede medirse de manera continua y compararse con un valor de impedancia de referencia objetivo o intervalo objetivo de valores de impedancia de referencia para determinar cuándo se alcanza la temperatura aceptable.

Durante la agitación, puede añadirse una cantidad suficiente de una mezcla de etanol-agua que tiene una concentración de etanol de, por ejemplo, aproximadamente el 53% a la mezcla de plasma para llevar la concentración de etanol de la disolución de plasma resultante hasta aproximadamente el 8% de etanol en volumen. Esta etapa se muestra en la figura 3 y puede monitorizarse y/o controlarse usando, por ejemplo, los sistemas a modo de ejemplo mostrados en las figuras 1 y 2. Específicamente, la concentración de alcohol de la mezcla de plasma puede determinarse o estimarse midiendo la impedancia de la mezcla durante la etapa de procedimiento de adición de alcohol para obtener un valor de impedancia medido, y el valor de impedancia medido puede compararse con un valor de impedancia de referencia objetivo o un intervalo de valores de impedancia de referencia objetivo que se determinaron previamente para esta etapa particular en el procedimiento. En una realización, si el valor de impedancia medido está dentro de un intervalo objetivo de valores de impedancia de referencia, el procedimiento puede desencadenar automáticamente una etapa posterior en el procedimiento de fraccionamiento.

La adición de un tampón, tal como pero sin limitarse a acetato de sodio-ácido acético, se monitoriza y/o controla a continuación usando IS para aumentar el pH de la disolución de aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 7,4. Si el tampón se añade sin cambiar otras variables de la mezcla de plasma, puede medirse la impedancia y compararse con un valor de impedancia de referencia para determinar el pH de la disolución. Sin embargo, si el tampón se añade en la disolución con la mezcla de etanol-agua, puede medirse la impedancia de la mezcla de plasma y compararse con un valor de impedancia de referencia o intervalo de valores de impedancia de referencia que se determinaron previamente basándose en el cambio en ambas variables para determinar si el procedimiento avanza según el plan de procedimiento.

Durante la adición de la mezcla de etanol-agua y/o tampón, la temperatura de la disolución de plasma se reduce de aproximadamente -2°C hasta aproximadamente -3°C mediante cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, un baño de agua y/o cables de enfriamiento. De nuevo, puede usarse IS para monitorizar y/o controlar esta etapa midiendo la impedancia y comparando los valores de impedancia medidos con valores de impedancia de referencia determinados bajo parámetros de procedimiento sustancialmente similares y con mezclas de plasma sustancialmente similares. En una realización, el tiempo global para la adición del alcohol y tampón es de aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 2 horas, y preferiblemente de aproximadamente 90 minutos.

Una vez obtenidos los parámetros del sistema anteriores, puede retirarse la fracción I de la disolución de plasma mediante, por ejemplo, centrifugación a una temperatura de aproximadamente -2°C hasta aproximadamente -3°C. Esta etapa de retirada puede monitorizarse y/o controlarse usando IS, ya que puede correlacionarse la impedancia con el grado de agregación de proteínas y/o separación de proteínas (véanse el ejemplo VIII y la figura 6 más adelante). Midiendo la impedancia durante la centrifugación, el procedimiento puede detenerse automáticamente o puede enviarse una notificación a un operario cuando el valor de impedancia medido está dentro de un intervalo objetivo de valores de impedancia de referencia o está dentro de una tolerancia aceptable de un valor de impedancia de referencia objetivo.

Finalmente, una vez obtenido el precipitado de fracción I, puede almacenarse en un estado no secado a aproximadamente -5°C, aunque se espera pérdida de fibrinógeno tras unos cuantos meses. Tal pérdida puede monitorizarse usando IS, ya que el envejecimiento de la proteína puede correlacionarse con la impedancia del precipitado de fracción I. Por tanto, puede medirse la impedancia del precipitado de fracción I almacenado y el valor de impedancia medido puede compararse con un valor de impedancia de referencia o intervalo de valores de impedancia de referencia para determinar la pérdida de fibrinógeno.

Fracción de Cohn II+III

La siguiente etapa en el procedimiento de fraccionamiento de Cohn a modo de ejemplo producirá la fracción de Cohn II+III, que contiene de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 85% de anticuerpos policlonales IgG, de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 30% de IgA, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 25% de IgM y cantidades traza de otros componentes tales como, por ejemplo, los factores de coagulación II, VII, IX, X y alfa y beta globulinas. Se contempla que puede usarse IS para monitorizar y/o controlar múltiples variables y/o subetapas en este procedimiento.

Tras la retirada de la fracción I de Cohn de la disolución de plasma, se enfría el sobrenadante resultante hasta aproximadamente -5°C, y se ajusta el pH a de aproximadamente 6,7 hasta aproximadamente 6,9 mediante la adición de un tampón. El tampón puede ser cualquier tampón conocido en la técnica, aunque puede ser preferiblemente el

mismo tampón que se usó en el procedimiento para eliminar la fracción I. Adicionalmente, se añade una disolución en etanol frío que tiene una concentración de aproximadamente etanol al 53% al sobrenadante de manera que la concentración de alcohol resultante en la disolución de plasma es de aproximadamente alcohol al 25% en volumen. En una realización, el tiempo total requerido para la adición del alcohol y el tampón es de aproximadamente 5 horas.

5 Tal como se describió anteriormente con respecto a la fracción I, puede usarse IS para monitorizar y/o controlar cada una de estas etapas de procedimiento, ya se produzcan secuencialmente o en combinación. Además, puede usarse IS de manera similar tal como se describió anteriormente con respecto a la fracción I para monitorizar y/o controlar la precipitación de la fracción II+III de la suspensión resultante usando métodos tales como pero sin limitarse a centrifugación y recogida.

10 Una vez retirada, la fracción II+III puede almacenarse en forma no secada durante aproximadamente un año sin degradación medible de la proteína. Se contempla que la impedancia de la fracción II+III no secada puede correlacionarse con la degradación de la proteína tal como se describió anteriormente, y pueden evitarse cambios sustanciales en la forma no secada mediante notificación de un operario a través de medición y comparación repetida y/o continua de la impedancia, preferiblemente en tiempo real o casi tiempo real.

#### 15 Fracción IV-1

20 De manera similar, puede usarse IS para monitorizar y/o controlar múltiples etapas en la precipitación de la fracción de Cohn IV-1 del sobrenadante resultante de la retirada de la fracción II+III. En este procedimiento, puede añadirse en primer lugar agua que tiene una temperatura de aproximadamente 0°C al sobrenadante para disminuir la concentración de etanol de la disolución hasta aproximadamente etanol al 18% en volumen. Puede añadirse un tampón tal como el tampón usado para obtener la fracción I y/o fracción II+III a la disolución de plasma de manera que el pH se reduce hasta desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 5,4. En una realización, la temperatura se mantiene constante a aproximadamente -5°C a lo largo de todo el procedimiento. Puede usarse IS para monitorizar y/o controlar de manera similar a la que se describió anteriormente con respecto a la fracción I, la concentración de alcohol y/o el pH de la mezcla de plasma, ya cambien estas variables al mismo tiempo o cambien en etapas separadas.

30 Tras completarse la adición de alcohol y tampón, se agita la mezcla de plasma durante aproximadamente una hora y se permite que repose durante desde aproximadamente 6 hasta aproximadamente 8 horas para permitir que se complete el precipitado. Debido a que puede correlacionarse la impedancia con variables tales como agregación de proteínas, envejecimiento de proteínas y concentración de proteínas, pueden usarse mediciones de impedancia de la mezcla de plasma agitada para determinar eficazmente si el precipitado está completo, ahorrando tiempo valioso. La impedancia de una suspensión de fracción IV-1 puede monitorizarse en tiempo real o casi tiempo real y compararse con un intervalo de referencia objetivo de valores de impedancia y/o un valor de impedancia objetivo para determinar si el precipitado está completo. Si la impedancia medida está dentro del intervalo de referencia objetivo de valores de impedancia, puede permitirse que el procedimiento continúe hasta la siguiente etapa. En otra realización, una vez que la impedancia medida está dentro del intervalo de referencia objetivo de valores de impedancia, puede alertarse a un operario.

La fracción IV-1 puede retirarse de la disolución de plasma mediante, por ejemplo, centrifugación y tal retirada puede monitorizarse y/o controlarse usando IS, tal como se describió anteriormente con respecto a la fracción I.

#### 45 Fracción IV-4

La fracción de Cohn IV-4 consiste principalmente en alfa y beta globulinas y albúmina. En una realización a modo de ejemplo, puede usarse IS para monitorizar y/o controlar las diversas etapas de procedimiento en la producción de fracción IV-4 a partir de una mezcla de plasma. Una vez retirada la fracción IV-1 de la mezcla de plasma, puede añadirse un tampón a la mezcla a lo largo de un periodo de aproximadamente 90 minutos con el fin de aumentar el pH hasta aproximadamente 5,8. Tras la adición del tampón, puede añadirse una disolución de etanol, tal como una disolución de etanol al 95%, a la disolución para aumentar la concentración de etanol hasta aproximadamente el 40% en volumen. La temperatura puede mantenerse constante a aproximadamente -5°C a lo largo de todo el procedimiento. Tal como se describió anteriormente con respecto a la fracción I, puede usarse IS para monitorizar y/o controlar el pH, la concentración de alcohol y/o la temperatura de la mezcla de plasma, ya cambien independientemente o en combinación. La fracción IV-4 puede retirarse de la disolución mediante, por ejemplo, centrifugación y tal retirada puede monitorizarse y/o controlarse usando IS de manera similar tal como se describió anteriormente con respecto a la fracción I.

#### 60 Fracción V

La fracción de Cohn V contiene el volumen de la albúmina presente en la reserva de plasma de partida y contiene generalmente menos del 3% de alfa-globulina y menos del 0,5% de beta-globulina. Se contempla que los métodos de IS descritos anteriormente con respecto a la fracción I puedan usarse para monitorizar y/o controlar la purificación de la fracción V de una disolución de plasma tal como el sobrenadante que queda tras la retirada de la fracción IV-4, que contiene principalmente albúmina con una pequeña cantidad de material suspendido. Este material suspendido

5 puede retirarse mediante, por ejemplo, filtración para producir una fracción altamente clarificada. En una realización, se añade Super-Cel convencional lavado al 0,5% a la disolución de plasma y se filtra la suspensión resultante a través de un filtro a aproximadamente -5°C. La impedancia de la mezcla de proteínas puede medirse a lo largo de toda la etapa de filtración, y compararse con valores de impedancia de referencia o un intervalo de valores de impedancia de referencia.

10 Tras la filtración, puede realizarse una etapa de lavado posterior mediante, por ejemplo, el uso de una disolución de etanol al 40% que contiene aproximadamente 0,1 moles de cloruro de sodio por litro de disolución. La etapa de lavado posterior puede monitorizarse y/o controlarse usando IS, ya que puede correlacionarse la impedancia con la concentración de proteína y la agregación de proteínas. Por tanto, la impedancia de la mezcla de plasma puede medirse a lo largo de todo el procedimiento de lavado posterior para determinar cuándo la impedancia medida está dentro de un intervalo objetivo de valores de impedancia de referencia y, por tanto, para determinar cuándo se completa el lavado posterior.

15 Tras la clarificación, se combinan todos los filtrados y lavados para dar una disolución, y se reduce el pH de la disolución hasta aproximadamente 4,8 mediante la adición de un tampón tal como acetato de sodio-ácido acético. La temperatura se mantiene constante desde aproximadamente -5°C hasta aproximadamente -6°C durante la adición del tampón, y dicha adición de tampón se realiza a lo largo del transcurso de aproximadamente 2 horas. Se permite que la disolución repose durante al menos 3 horas sin agitar, y la pasta de fracción V puede precipitarse mediante, por ejemplo, centrifugación o filtración. De nuevo, puede usarse IS para monitorizar y/o controlar la adición de tampones, el cambio de temperatura y/o el grado de separación de la fracción V tal como se describió anteriormente.

20 En una realización, la pasta de fracción V puede purificarse adicionalmente para eliminar el contenido en electrolitos para su uso en determinadas aplicaciones clínicas y tal purificación puede monitorizarse y/o controlarse usando IS. En esta realización, puede añadirse una disolución de etanol y un tampón tal como se describió anteriormente a lo largo del transcurso de aproximadamente 2 horas a la pasta de fracción V para preparar una disolución que contiene aproximadamente proteína al 3%, etanol al 10%, sal 0,01 M y un pH de aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 4,7. Generalmente, la temperatura se reduce durante la adición de aproximadamente -2°C hasta aproximadamente -3°C. La disolución turbia resultante se agita suavemente, pero concienzudamente, durante aproximadamente dos horas adicionales.

25 Aún en otra realización, la disolución resultante de la realización anterior puede filtrarse adicionalmente mediante, por ejemplo, la suspensión de aproximadamente el 0,25% de Super-Cel convencional en la disolución y la filtración a través de una almohadilla filtrante a una temperatura de aproximadamente -2°C. Si cualquier albúmina se ocluye por la torta de filtro, puede retirarse por lavado con un pequeño volumen de disolución que comprende, por ejemplo, etanol a aproximadamente el 10% a -2°C. Puede usarse IS para monitorizar y/o controlar las etapas de procedimiento de filtración y lavado posterior y, aunque se describe en el presente documento con respecto a la purificación de la fracción V, se apreciará que cualquiera de los productos intermedios de plasma fraccionado puede filtrarse y/o lavarse, y tal filtración y/o lavado puede monitorizarse y/o controlarse por medio de las técnicas de IS descritas en el presente documento. Por ejemplo, y tal como se muestra en la figura 17, puede usarse IS para monitorizar y/o controlar el lavado posterior y/o la filtración de la fracción II+III.

30 En otra realización, si se determina que el nivel de impurezas inestables en la disolución es superior a lo deseado o permitido o bien por los métodos de IS o bien de otra forma, la concentración de etanol del lavado puede elevarse de aproximadamente el 10% hasta aproximadamente el 15% y la temperatura puede reducirse de aproximadamente -2°C hasta aproximadamente -5°C. De nuevo, puede usarse IS para monitorizar y/o controlar esta etapa de procedimiento tal como se describió anteriormente.

35 Una vez filtrada, puede precipitarse la albúmina del filtrado elevando la concentración de etanol de la disolución hasta aproximadamente el 40% a través de la adición de, por ejemplo, una disolución de etanol al 95%. Durante la adición de etanol, el pH puede elevarse de aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 5,4 mediante la adición de, por ejemplo, bicarbonato de sodio, mientras que la temperatura se reduce de aproximadamente -5°C hasta aproximadamente -6°C. Este procedimiento puede tardar aproximadamente dos horas en completarse y, una vez obtenidos los parámetros deseados (tal como se mide y/o determina usando mediciones de impedancia), puede retirarse la albúmina mediante centrifugación o filtración. La albúmina puede secarse a partir del estado congelado a una temperatura tan baja como sea práctico.

40 Se apreciará que los sistemas de control de procesos descritos en el presente documento pueden usarse para controlar, ajustar y/o monitorizar cualquier etapa en muchas variaciones del procedimiento de fraccionamiento de Cohn descrito anteriormente. Por ejemplo, en una realización, los sistemas de control de procesos descritos en el presente documento, tales como, pero sin limitarse a, las realizaciones a modo de ejemplo mostradas en las figuras 1 y 2, pueden usarse para controlar, ajustar y/o monitorizar la preparación de cualquier composición intermedia a partir de un procedimiento de Kistler, o cualquier variante del mismo. En una realización específica, puede usarse espectroscopía de impedancia para monitorizar y/o controlar cada etapa en la producción de precipitado de Kistler A, precipitado de Kistler B, precipitado de Kistler IV, precipitado de Kistler C, precipitado de Kistler D a partir de un procedimiento de Kistler o cualquier variación, combinación o modificación del mismo.

En otra realización a modo de ejemplo, los sistemas de control de procesos descritos en el presente documento, tales como, pero sin limitarse a, las realizaciones a modo de ejemplo mostradas en las figuras 1 y 2, que usan mediciones de impedancia para controlar y/o monitorizar procedimientos con proteínas, pueden usarse para controlar, ajustar y/o monitorizar la preparación de cualquier composición intermedia a partir de un procedimiento de Tescher, o cualquier variante del mismo. La impedancia puede medirse y compararse con valores de impedancia de referencia o intervalos de valores de impedancia de referencia en cualquier etapa de procedimiento en el procedimiento de Tescher, tal como pero sin limitarse a: crioseparación, adsorción de factores de coagulación sanguínea y antitrombina, fraccionamiento con etanol modificado, tratamiento S/D, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, ultra/diafiltración, nanofiltración, relleno de fórmula de concentración, liofilización y/o incubación. En una realización específica, puede usarse espectroscopía de impedancia para monitorizar y/o controlar cada etapa en la producción de precipitado de Tescher G. Debido a que los sistemas y métodos reivindicados en el presente documento no se limitan a un procedimiento con proteínas particular, se apreciará que cualquier variación, combinación o modificación del procedimiento de Tescher puede monitorizarse y/o controlarse usando IS.

#### Método para monitorizar y/o controlar un procedimiento de fraccionamiento de Oncley

En otro procedimiento a modo de ejemplo, los sistemas de control de procesos descritos en el presente documento pueden usarse para controlar, ajustar y/o monitorizar cualquier etapa en el procedimiento de fraccionamiento de Oncley o cualquier variante del mismo. En una realización específica, puede usarse IS para monitorizar y/o controlar: la concentración de alcohol, la fuerza iónica, el pH, la temperatura, la purificación, la centrifugación, la separación de proteínas, la aglomeración de proteínas, la concentración de proteínas y/o el envejecimiento de proteínas en cada etapa de la producción de fracción II+IIIw, fracción II y fracción III.

#### Fracción II+IIIw

En una realización, se emplean técnicas de control y monitorización de la impedancia descritas en el presente documento en un procedimiento de producción de fracción II+IIIw. En primer lugar, puede suspenderse un precipitado de fracción II+III en agua fría en una razón en volumen de aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:15, o aproximadamente 1:20 de fracción II+III con respecto a agua. Tales razones en volumen pueden determinarse usando IS, tal como se describió anteriormente, ya que estos valores pueden corresponderse con la concentración de proteína. La fuerza iónica de la mezcla de plasma resultante puede monitorizarse y/o ajustarse usando IS tal como se describió anteriormente hasta desde aproximadamente 0,003 m hasta aproximadamente 0,005 m mediante la adición de, por ejemplo, una disolución de fosfato de sodio. También puede añadirse una disolución de etanol a la mezcla de plasma de manera que la mezcla resultante tiene una concentración de alcohol de aproximadamente el 20% hasta aproximadamente el 25% de alcohol en volumen. Tal adición de alcohol puede controlarse y/o monitorizarse usando IS de manera similar tal como se describió anteriormente con respecto a un procedimiento de fraccionamiento de Cohn a modo de ejemplo. Generalmente, la temperatura de la disolución puede reducirse hasta aproximadamente -5°C durante el procedimiento, y el pH puede mantenerse o ajustarse hasta desde aproximadamente 7,2 hasta aproximadamente 7,6 mediante, por ejemplo, el uso de un tampón acetato o hidróxido de sodio diluido. Estas etapas de procedimiento pueden monitorizarse y/o controlarse usando IS ya se completan en combinación o independientemente. Una vez obtenidos los parámetros necesarios, puede recuperarse el precipitado de fracción II+IIIw mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a centrifugación y/o filtración a aproximadamente -5°C.

#### Fracciones II y III

Se contempla que las técnicas de control, monitorización y medición de la impedancia de la presente solicitud son útiles en cualquiera de varios procedimientos para el almacenamiento y/o la separación de productos intermedios de plasma fraccionado, tales como pero sin limitarse a fracción II+IIIw, para dar componentes y subcomponentes individuales. En una realización a modo de ejemplo, puede disolverse un precipitado de fracción II+IIIw en una cantidad suficiente de agua a una temperatura de aproximadamente -5°C para dar como resultado una disolución que tiene una concentración de proteína del 1%. Tanto el cambio de temperatura como la concentración de proteína pueden determinarse y/o controlarse usando IS de manera similar tal como se describió anteriormente con respecto a un procedimiento de fraccionamiento de Cohn a modo de ejemplo. El pH de la disolución puede mantenerse o ajustarse a aproximadamente 7,2, y puede añadirse etanol frío de manera que la disolución tiene una concentración de alcohol resultante de aproximadamente el 20% hasta aproximadamente el 25% de alcohol en volumen, y tales etapas de procedimiento pueden monitorizarse y/o controlarse usando IS tal como se describió anteriormente. En una realización, se permite que la disolución repose a aproximadamente -5°C durante una cantidad de tiempo de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 24 horas. Tal como se describió anteriormente, puede usarse IS para monitorizar y/o controlar la separación de la fracción II, que contiene de aproximadamente el 95% a aproximadamente el 99% de anticuerpos policlonales IgG, de al menos el 0,01% a aproximadamente el 2% de IgM y cantidades traza de sal mediante, por ejemplo, centrifugación de la mezcla de plasma.

Una vez retirada la fracción II de la mezcla de plasma, puede usarse IS para controlar y/o monitorizar la precipitación

de la fracción III del sobrenadante ajustando el pH a aproximadamente 5,7 y añadiendo alcohol para alcanzar una concentración final de alcohol a aproximadamente el 25% en volumen. Entonces puede permitirse que la mezcla repose sin modificación adicional durante una cantidad de tiempo de aproximadamente 2 hasta aproximadamente 24 horas, dependiendo del grado de separación, que puede monitorizarse y/o controlarse usando IS. La fracción III, que contiene al menos aproximadamente el 25% de anticuerpos policlonales IgG, de al menos aproximadamente el 5% a aproximadamente el 30% de IgA y de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 25% de IgM, junto con cantidades traza de factores de coagulación II, VII, IX, alfa y beta globinas y lípidos, puede retirarse entonces mediante, por ejemplo, centrifugación monitorizada y/o controlada mediante IS. De manera importante, puede emplearse IS en cada etapa en la producción de fracción III, ya se complete cada etapa independientemente o en combinación con otras etapas, siempre que se obtenga previamente un valor de impedancia de referencia o intervalo de valores de impedancia de referencia.

#### Método para monitorizar y/o controlar un procedimiento de purificación de inmunoglobulina

En otra realización, los sistemas y métodos de impedancia descritos en el presente documento pueden usarse para monitorizar y/o controlar la separación de inmunoglobulinas de productos intermedios de plasma fraccionado, tales como pero sin limitarse a fracción de Cohn I, fracción de Cohn II, fracción de Cohn III, fracción de Cohn II+III y/o fracción de Cohn I+II+III. En una primera etapa, se suspende un producto intermedio de plasma fraccionado en agua a un pH ácido y temperatura sustancialmente no desnaturizante. Tal como se usa en el presente documento, "sustancialmente no desnaturizante" significa que la condición a la que se refiere el término no provoca una pérdida irreversible sustancial de la actividad biológica de las globulinas séricas inmunitarias. Tales temperaturas y niveles de pH pueden determinarse, monitorizarse, ajustarse y/o controlarse usando IS de manera similar tal como se describió anteriormente con respecto a un procedimiento de fraccionamiento de Cohn a modo de ejemplo.

La fracción de proteína plasmática en bruto puede suspenderse en agua fría a volúmenes de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10 veces el peso de la fracción. El agua se mantiene preferiblemente a una temperatura fría que impide la desnaturalización sustancial de las proteínas globulinas séricas inmunitarias. Se emplean normalmente temperaturas de aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 10°C, preferiblemente de aproximadamente 1°C hasta aproximadamente 3°C. Además, la suspensión puede acidificarse opcionalmente con un ácido no desnaturizante y el pH de la suspensión puede mantenerse de aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 5,5, preferiblemente de aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 5,2. Similar a lo descrito anteriormente para un procedimiento de fraccionamiento de Cohn a modo de ejemplo, las temperaturas y los valores de pH de este procedimiento de purificación de inmunoglobulinas a modo de ejemplo también pueden monitorizarse y/o controlarse usando IS.

Añadiendo un precipitante de proteínas, pueden precipitarse proteínas globulinas no séricas, lípidos y algunos virus de la suspensión sin provocar precipitación sustancial de globulinas séricas inmunitarias. Se conocen bien precipitantes de proteínas sustancialmente no desnaturizantes, solubles en agua en las técnicas de purificación de proteínas, y los precipitantes de proteínas adecuados incluyen, por ejemplo, diversas formas de peso molecular de polietilenglicol, sulfato de amonio, polivinilpirrolidona y compuestos plurónicos. El precipitante de proteínas puede añadirse a la suspensión de proteínas plasmáticas en bruto como un sólido o un concentrado acuoso derivado de copos o polvo sólidos disponibles comercialmente. La cantidad real de precipitante de proteínas usado variará dependiendo del precipitante particular empleado, la temperatura, el pH y la concentración de proteína en suspensión, sin embargo, puede usarse IS para monitorizar y/o controlar la adición basándose en estos parámetros. Generalmente, la precipitación se mantiene a una baja temperatura (por ejemplo, inferior a aproximadamente 10°C) y se permite que avance hasta que se alcanza el equilibrio (por ejemplo, generalmente durante aproximadamente una hora o más).

Tras la precipitación, se recupera un líquido que contiene inmunoglobulinas de la mezcla sólido-líquida resultante de la precipitación. La recuperación del líquido clarificado puede lograrse mediante técnicas de separación sólido-líquido convencionales, tales como centrifugación y filtración, y tal recuperación puede monitorizarse usando IS para determinar si se ha completado (grado de separación de proteínas) y/o parámetros de procedimiento de manera similar tal como se describió anteriormente con respecto a procedimientos de fraccionamiento de Cohn a modo de ejemplo.

Los virus infecciosos que todavía pueden estar presentes en la fracción de proteínas plasmáticas en bruto pueden inactivarse añadiendo una cantidad virídica de un agente de inactivación de virus al líquido clarificado que contiene globulinas séricas inmunitarias. Generalmente, se cree que las técnicas de impedancia de la presente invención son útiles en la monitorización de la adición de agentes de inactivación de virus tales como: detergentes (por ejemplo, alquilfenoles oxietilados, derivados polietilados de un éster parcial de un ácido graso C<sub>12-22</sub> y un anhídrido de hexatol, éster alquílico inferior de ácido fosfórico, y combinaciones de los mismos). En general, la etapa de inactivación de virus se realiza en condiciones de inactivación de virus. Estas condiciones incluyen temperaturas de aproximadamente 10°C hasta aproximadamente 30°C, preferiblemente de aproximadamente 18°C hasta aproximadamente 22°C. Además, puede ser suficiente un tiempo de incubación de aproximadamente una hora.

En otra realización, una vez completada la inactivación del virus, la disolución que contiene inmunoglobulinas puede

ponerse en contacto con una resina de intercambio catiónico para eliminar el agente de inactivación de virus y otros contaminantes distintos de globulinas séricas. Como ejemplo, la disolución puede hacerse pasar sobre una columna empaquetada con una resina de intercambio catiónico, tal como carboximetilagarosa. La columna puede equilibrarse con un tampón, tal como un acetato, capaz de convertir la resina en la forma de sal. La mezcla resultante puede monitorizarse y/o controlarse usando IS, de manera que la impedancia de la disolución pueda medirse y compararse con los valores de impedancia de referencia de un procedimiento sustancialmente similar que usa componentes sustancialmente similares.

Antes de cargar la disolución que contiene inmunoglobulinas sobre la columna, la concentración de sal de la disolución puede monitorizarse y ajustarse usando IS, hasta una cantidad sustancialmente equivalente a la concentración de sal del tampón de equilibración. Generalmente, tras cargarse la disolución sobre una columna, la columna se lava secuencialmente con el mismo tampón usado para la equilibración y el procedimiento de lavado también puede monitorizarse y/o controlarse usando IS.

Las inmunoglobulinas pueden eluirse entonces de la resina de intercambio catiónico con un tampón sustancialmente no desnaturante que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para provocar una elución sustancial de las inmunoglobulinas. De manera similar tal como se describió anteriormente con respecto a un procedimiento de fraccionamiento de Cohn, puede usarse IS para establecer parámetros tales como: el pH (preferiblemente de aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 8,5), la concentración de sal, la concentración de polietilenglicol y/o glicina. Una vez eluidas las inmunoglobulinas, el eluato puede concentrarse y filtrarse, y el procedimiento puede repetirse según se desee o se requiera. En una realización, el procedimiento puede repetirse si la concentración de inmunoglobulinas, tal como se determina usando IS, está por debajo de un valor deseado o requerido. Se contempla que cambios mínimos en otros componentes de una disolución que no dan como resultado un cambio medible o significativo en la impedancia de la disolución no afectarán material o significativamente a la correlación global de valores de impedancia con cualquier característica particular de la disolución incluyendo: concentración iónica, concentración de proteína, concentración de precipitante orgánico miscible con agua, pH, temperatura y/o cualquier combinación de los mismos.

La descripción anterior y los dibujos son ilustrativos de la invención, pero no deben interpretarse como limitativos de la invención. Se describen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de diversas realizaciones de la presente invención, sin embargo, en determinados casos, no se describen detalles bien conocidos o convencionales con el fin de proporcionar una discusión concisa de realizaciones de las presentes invenciones.

## Ejemplos

### Ejemplo I

En una realización a modo de ejemplo, se midieron intervalos de valores de impedancia de referencia a varias frecuencias diferentes y valores de pH para una disolución de albúmina. Se añadió una cantidad predeterminada, medida de disolución básica a la disolución de albúmina mientras que todas las demás propiedades físicas y químicas se mantuvieron constantes. Se tomaron múltiples mediciones de impedancia a varias frecuencias y se almacenaron en un ordenador de uso general. Se repitieron estas etapas para niveles de pH de 3,2, 4,2 y 7,4. Los datos muestran que la impedancia compleja de una disolución de albúmina al 5% en volumen puede depender de y puede correlacionarse con el pH.

En referencia a la figura 4, se muestra un gráfico de Nyquist a modo de ejemplo en el que la parte real de la impedancia de la disolución de albúmina al 5% en volumen se representa gráficamente frente a la parte imaginaria de la impedancia de la misma disolución a múltiples frecuencias que oscilan entre 2KHz y 1,7 MHz y a múltiples niveles de pH. Por tanto, el efecto del pH sobre la impedancia se observa claramente a través de inspección visual del gráfico de Nyquist a modo de ejemplo y, por tanto, puede correlacionarse la impedancia con el pH.

En una realización a modo de ejemplo, puede usarse el gráfico de Nyquist de la figura 4 para extrapolar el nivel de pH de una disolución de muestra que tiene por lo demás la misma composición o similar, basándose en mediciones de impedancia de una disolución de este tipo a frecuencias que oscilan entre 2 KHz y 1,7 MHz. Se contempla que los valores de impedancia de cualquier disolución pueden correlacionarse con el pH de la disolución usando un gráfico de Nyquist similar al mostrado en la figura 4.

Se determinó la correlación de las partes real e imaginaria de la impedancia ( $Re Z$  e  $Im Z$ , respectivamente) de la disolución de albúmina con la concentración de pH de esa disolución. Con el fin de resolver el/los intervalo(s) de frecuencia óptimo(s) que iban a implementarse, se empleó software estadístico (Minitab 15.1.1.0) y se determinaron las siguientes ecuaciones de regresión lineal:

#### *Ecuación 5*

$$Re Z (f) = A (f) \times pH + B (f)$$

Ecuación 6

$$\text{Im Z (f)} = \text{A}' (\text{f}) \times \text{pH} + \text{B}' (\text{f})$$

5 La tabla I a continuación presenta los resultados de las mediciones de impedancia que indican la fuerte correlación ( $R^2 > 95\%$ ) entre Re Z (a frecuencias por debajo de 50 kHz) e Im Z (a frecuencias por encima 50 KHz) y el pH. Se resolvieron los coeficientes A, B, A', B' así como los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) correspondientes a diferentes frecuencias y se presentan en la tabla I. Se definieron los intervalos de frecuencia óptimos de 6,3, 15,9 y 50,2 para Re Z y 159,0 y 502,4 para Im Z (mostrados en negrita) como aquellos en los que el  $R^2 \geq 95\%$  para o bien Re Z o bien Im Z.

Tabla 1

| f (kHz)      | Log (f)    | Re Z        |             |                | Im Z         |              |                |
|--------------|------------|-------------|-------------|----------------|--------------|--------------|----------------|
| -            | -          | A           | B           | R <sup>2</sup> | A'           | B'           | R <sup>2</sup> |
| <b>6,3</b>   | <b>3,8</b> | <b>10,2</b> | <b>84,2</b> | <b>99,6</b>    | 0,60         | -0,89        | 94,7           |
| <b>15,9</b>  | <b>4,2</b> | <b>10,4</b> | <b>84,3</b> | <b>99,6</b>    | 1,98         | 3,23         | 94,9           |
| <b>50,2</b>  | <b>4,7</b> | <b>9,9</b>  | <b>85,7</b> | <b>99,6</b>    | <b>7,2</b>   | <b>14,8</b>  | <b>95,2</b>    |
| <b>159,0</b> | 5,2        | 1,82        | 91,3        | 78,3           | <b>17,2</b>  | <b>75,8</b>  | <b>94,0</b>    |
| <b>502,4</b> | 5,7        | -3,15       | 3,88        | 93,2           | <b>-3,76</b> | <b>130,8</b> | <b>96,9</b>    |
| 843,0        | 5,9        | -0,5        | -14,8       | 93,4           | -2,5         | 56,4         | 83,9           |
| 1589,0       | 6,2        | 0,5         | -8,8        | 66,9           | -0,9         | 12,2         | 91,2           |

15 Ejemplo II

Se mostró que la impedancia compleja de una disolución de albúmina al 5% en volumen era dependiente de la concentración de sodio. Se midieron intervalos de valores de impedancia de referencia a varias frecuencias y concentraciones de sodio diferentes. Se añadió una cantidad predeterminada, medida de sodio a la disolución de albúmina mientras que todas las demás propiedades físicas y químicas se mantuvieron constantes, y se tomaron múltiples mediciones de impedancia a diferentes frecuencias y se almacenaron en un ordenador de uso general. Se completaron estas etapas para concentraciones de sodio del 0% en peso, el 3,3% en peso, el 9,5%, en peso y el 15% en peso.

25 En referencia a la figura 5, se muestra un gráfico de Nyquist a modo de ejemplo en el que la parte real de la impedancia de la disolución de albúmina al 5% en volumen se representa gráficamente frente a la parte imaginaria de la impedancia de la misma disolución a múltiples frecuencias que oscilan entre aproximadamente 1 KHz y aproximadamente 2 MHz y a múltiples niveles de concentración de sodio. Tal como se muestra, se determinaron los valores de impedancia a múltiples frecuencias para niveles de sodio del 0% en peso, el 3,3% en peso, el 9,5%, en peso y el 15% en peso. Por tanto, el efecto de la concentración de sodio sobre la impedancia de la disolución de albúmina se observa a través de inspección visual del gráfico de Nyquist a modo de ejemplo y, por tanto, puede correlacionarse la impedancia con la concentración de sodio.

35 En una realización a modo de ejemplo, puede usarse el gráfico de Nyquist de la figura 5 para extrapolar la concentración de sodio de una disolución de muestra que tiene por lo demás la misma composición o similar, basándose en mediciones de impedancia de una disolución de este tipo a frecuencias que oscilan entre aproximadamente 1 KHz y aproximadamente 2 MHz. Se contempla que los valores de impedancia de cualquier disolución pueden correlacionarse con la concentración de sodio de la disolución usando un gráfico de Nyquist similar al mostrado en la figura 5.

Ejemplo III

45 Se mostró que la impedancia compleja de una suspensión de una fracción II+III que contenía alcohol al 20% en volumen disminuía tras la centrifugación. En una realización a modo de ejemplo, se midieron intervalos de valores de impedancia de referencia a varias frecuencias diferentes antes y después de la centrifugación. Se realizó la centrifugación durante 30 minutos a 5000 G de fuerza a una temperatura de -3° C.

50 Los resultados se muestran en el gráfico de Nyquist a modo de ejemplo de la figura 6, en el que la parte real de la impedancia de la disolución se representa gráficamente frente a la parte imaginaria de la impedancia de la misma disolución a múltiples frecuencias que oscilan entre aproximadamente 1 KHz y aproximadamente 2 MHz. Tal como se muestra, la impedancia de la suspensión de fracción II+III en alcohol al 20% se vio afectada por el procedimiento de centrifugación. Por tanto, puede correlacionarse la impedancia con el grado de separación líquido-sólido.

55 En una realización a modo de ejemplo, puede usarse el gráfico de Nyquist de la figura 6 para extrapolar el grado de separación líquido-sólido de una disolución de muestra, que tiene por lo demás la misma composición o similar,

basándose en mediciones de impedancia de una disolución de este tipo a frecuencias que oscilan entre aproximadamente 1 KHz y aproximadamente 2 MHz. Se contempla que los valores de impedancia de cualquier suspensión de proteínas pueden correlacionarse con el grado de separación líquido-sólido usando un gráfico de Nyquist similar al mostrado en la figura 6.

5

#### Ejemplo IV

Se determinó que la impedancia compleja de una mezcla de plasma crioempobrecido era dependiente de la concentración de alcohol. Se midieron intervalos de valores de impedancia de referencia a varias frecuencias y concentraciones de alcohol diferentes. Se añadió una cantidad predeterminada, medida de alcohol a la mezcla crioempobrecida mientras que todas las demás propiedades físicas y químicas se mantuvieron constantes y se tomaron múltiples mediciones de impedancia a diferentes frecuencias y se almacenaron en un ordenador de uso general. Se completaron estas etapas para concentraciones de alcohol del 0% en volumen, el 8% en volumen y el 20% en volumen. Adicionalmente, en una segunda ronda, se completaron estas etapas para concentraciones de alcohol adicionales del 11% en volumen, el 14% en volumen y el 17% en volumen.

10

15

En referencia a la figura 7, se muestra un gráfico de Nyquist a modo de ejemplo en el que la parte real de la impedancia de una mezcla de plasma crioempobrecido se representa gráficamente frente a la parte imaginaria de la impedancia de la misma disolución a múltiples frecuencias que oscilan entre aproximadamente 1 KHz y aproximadamente 2 MHz y a múltiples niveles de concentración de alcohol. Se determinaron los valores de impedancia a múltiples frecuencias para niveles de concentración de alcohol del 0%, el 8%, el 11%, el 14%, el 17% y el 20% en volumen. Por tanto, el efecto de la concentración de alcohol sobre la impedancia de la mezcla de plasma crioempobrecido se observa claramente a través de la inspección visual del gráfico de Nyquist a modo de ejemplo y, por tanto, puede correlacionarse la impedancia con la concentración de alcohol de mezclas de plasma crioempobrecido.

20

25

En una realización a modo de ejemplo, puede usarse el gráfico de Nyquists de la figura 7 para extrapolar la concentración de alcohol en una disolución de muestra de plasma crioempobrecido basándose en mediciones de impedancia de una disolución de este tipo a frecuencias que oscilan entre aproximadamente 1 KHz y aproximadamente 2 MHz, sin conocer la concentración de alcohol.

30

#### Ejemplo V

Se determinó que la impedancia compleja de una pasta de fracción II+III suspendida en tampón acetato-fosfato era dependiente del envejecimiento de la proteína. Se midieron intervalos de valores de impedancia de referencia a varias frecuencias y tiempos de envejecimiento de la suspensión diferentes. Se tomaron múltiples mediciones de impedancia a diferentes frecuencias y a cada intervalo de tiempo predeterminado, y se almacenaron estas mediciones en un ordenador de uso general. Se midió la impedancia a intervalos de tiempo que oscilaban entre aproximadamente 0 minutos y múltiples horas (es decir, "durante la noche"). Tal como puede observarse en la figura 8, a medida que una disolución de proteína envejece, la impedancia de una disolución de este tipo puede cambiar a lo largo del tiempo.

35

40

En referencia a la figura 8, se muestra un gráfico de Nyquist a modo de ejemplo en el que la parte real de la impedancia de la suspensión se representa gráficamente frente a la parte imaginaria de la impedancia de la misma suspensión a múltiples frecuencias que oscilan entre aproximadamente 1 KHz y aproximadamente 2 MHz y a múltiples tiempos que oscilan entre 0 minutos y múltiples horas (es decir, "durante la noche"). Tal como se muestra, se determinaron los valores de impedancia a múltiples frecuencias 810 para el tampón acetato-fosfato antes de añadir una pasta de fracción II+III. Se determinaron los valores de impedancia a múltiples frecuencias en el momento de la adición de la pasta 820 de fracción II+III, 1 hora tras la adición 830 y múltiples horas tras la adición 840. Por tanto, el efecto de envejecimiento sobre la pasta de fracción II+III suspendida en tampón acetato-fosfato se observa claramente a través de inspección visual del gráfico de Nyquist a modo de ejemplo y puede correlacionarse la impedancia con tal envejecimiento.

45

50

En una realización a modo de ejemplo, puede usarse el gráfico de Nyquist de la figura 8 para extrapolar la edad de una mezcla de proteínas basándose en mediciones de impedancia de una disolución de este tipo a frecuencias que oscilan entre aproximadamente 1 KHz y aproximadamente 2 MHz. Se contempla que los valores de impedancia de cualquier disolución de proteína pueden correlacionarse con su edad usando un gráfico de Nyquist similar al mostrado en la figura 8.

55

#### Ejemplo VI

En una realización a modo de ejemplo, se usó IS para monitorizar la concentración de inmunoglobulina G humana (IgG) en un fluido biológico. Se determinó la correlación de las partes real e imaginaria de la impedancia ( $Re Z$  e  $Im Z$ , respectivamente) de un fluido biológico con la concentración de IgG en el fluido biológico midiendo la impedancia del fluido biológico a determinadas frecuencias durante un procedimiento de suspensión. Se suspendieron aproximadamente 1,6 l de pasta de fracción II+III en una composición de tampón de extracción. Se contuvo la

65

mezcla en un tanque de proceso con camisa de 10 litros y se mantuvo la temperatura constante usando un baño de agua.

5 Se midió la concentración de IgG a tiempos predeterminados usando un sistema de inmunoquímica Image® 800 comercializado por Beckman Coulter, Inc. Las mediciones de concentración se muestran en la tabla II a continuación con los valores de concentración de IgG centrada frente a promedio correspondientes, que se calcularon según la ecuación 7 y se muestran gráficamente en la figura 9.

10 *Ecuación 7*

$$\text{Concentración de IgG centrada frente a promedio} = \frac{(\text{IgG} - \overline{\text{IgG}})}{\overline{\text{IgG}}}$$

Tabla II

| Tiempo (minutos) | IgG (mg/dl) | Concentración de IgG cent. frente a prom. |
|------------------|-------------|---|
| 0                | 58,8        | -0,77                                     |
| 5                | 140         | -0,46                                     |
| 10               | 199         | -0,23                                     |
| 15               | 277         | 0,07                                      |
| 30               | 279         | 0,08                                      |
| 60               | 385         | 0,49                                      |
| 120              | 469         | 0,82                                      |

15 Se monitorizó la impedancia a los mismos intervalos de tiempo predeterminados mostrados en la tabla II para determinar Re Z e Im Z usando un medidor de LCR de precisión 4989 de Agilent con un sensor de conductividad esterilizable TB457 ABB unido al mismo. Adicionalmente, se determinó la impedancia de referencia (Re Z<sub>Tampón</sub> e Im Z<sub>Tampón</sub>) midiendo la impedancia compleja del tampón de extracción antes de añadir la pasta de fracción II+III. Tal como se muestra en las ecuaciones 8-11, se restan estas mediciones de cada medición de Re Z e Im Z para determinar ΔRe Z y ΔIm Z.

25 *Ecuación 8*

$$\Delta\text{Re Z} = \text{Re Z} - \text{Re Z}_{\text{Tampón}}$$

*Ecuación 9*

$$\Delta\text{Re Z centrada frente a promedio} = \frac{\Delta\text{Re Z} - \overline{\Delta\text{Re Z}}}{\overline{\Delta\text{Re Z}}}$$

30 *Ecuación 10*

$$\Delta\text{Im Z} = \text{Im Z} - \text{Im Z}_{\text{Tampón}}$$

35 *Ecuación 11*

$$\Delta\text{Im Z centrada frente a promedio} = \frac{\Delta\text{Im Z} - \overline{\Delta\text{Im Z}}}{\overline{\Delta\text{Im Z}}}$$

40 Se determinaron las partes real e imaginaria de la impedancia a frecuencias (f), que se determinó previamente que permitían una fuerte correlación de la señal de impedancia respectiva con la concentración de IgG. Se tomaron las mediciones de Re Z a una frecuencia de 1,6 kHz (log(f) = 3,2) y se calcularon los valores centrados frente a promedio según la ecuación 9 y se muestran gráficamente en la figura 10. Se tomaron las mediciones de Im Z a una frecuencia de 50,2 kHz (log(f) = 4,7) y se calcularon los valores centrados frente a promedio según la ecuación 11 y se muestran gráficamente en la figura 11. La tabla III indica los resultados de las mediciones e incluye adicionalmente ΔIm Z centrada frente a promedio y ΔRe Z centrada frente a promedio.

Tabla III

| Tiempo (minutos)     | Re Z<br>f=1,6 kHz | Im Z<br>f=50,2 kHz | $\Delta$ Re Z<br>f=1,6 kHz | $\Delta$ Im Z<br>f=50,2 kHz | $\Delta$ Re Z cent.<br>frente a prom.<br>f=1,6 kHz | $\Delta$ Im Z cent.<br>frente a prom.<br>f=50,2 kHz |
|----------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|-----------------------------|--|---|
| Mediciones de tampón | -54,59            | -38,99             |                            |                             |  |   |
| 0                    | -45,75            | -25,18             | 8,84                       | 13,80                       | -0,41  | -0,33   |
| 5                    | -43,25            | -22,46             | 11,34                      | 16,53                       | -0,25  | -0,20   |
| 10                   | -41,01            | -19,81             | 13,58                      | 19,18                       | -0,10  | -0,07   |
| 15                   | -40,20            | -19,09             | 14,38                      | 19,90                       | -0,05  | -0,03   |
| 30                   | -38,88            | -17,74             | 15,71                      | 21,25                       | 0,04   | 0,03  |
| 60                   | -36,14            | -14,01             | 18,45                      | 24,98                       | 0,22   | 0,21  |
| 120                  | -31,25            | -10,41             | 23,34                      | 28,58                       | 0,55   | 0,39  |
| Promedios            |                   |                    | 15,09                      | 20,60                       |  |   |

Con el fin de determinar el/los intervalo(s) de frecuencia óptimo(s) que van a implementarse, se empleó software estadístico (Minitab 15.1.1.0) y se determinaron las siguientes ecuaciones de regresión lineal:

5

Ecuación 12

$$\Delta \lg G = A(f) + B(f) \cdot \Delta \text{Re } Z$$

10

Ecuación 13

$$\Delta \lg G = A'(f) + B'(f) \cdot \Delta \text{Im } Z$$

Se resolvieron los coeficientes A, B, A', B' así como los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) correspondientes, y los errores estándar de la regresión (S) a diferentes frecuencias y se presentan en la tabla IV. Se definieron entonces los intervalos de frecuencia óptimos de 1,59, 6,3, 15,9 y 50,2 (mostrados a continuación en negrita) como aquellos en los que el  $R^2 \geq 95\%$  para o bien  $\Delta \text{Re } Z$  o bien  $\Delta \text{Im } Z$  y S es mínimo.

15

Tabla IV

20

| f (kHz)     | Log (f)    | $\Delta \text{Re } Z$ |             |              |             | $\Delta \text{Im } Z$ |             |              |             |
|-------------|------------|-----------------------|-------------|--------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------|-------------|
|             |            | A                     | B           | $R^2$        | S           | A'                    | B'          | $R^2$        | S           |
| 0,05        | 1,7        | 0,0                   | 0,0         | 29,8%        | 0,50        | 0,0                   | 0,03        | 0,4%         | 0,595       |
| 0,1         | 2,0        | 0,0                   | 2,1         | 94,4%        | 0,15        | 0,0                   | 1,29        | 44,5%        | 0,444       |
| 0,63        | 2,8        | 0,0                   | 1,7         | 94,0%        | 0,15        | 0,0                   | 3,56        | 81,6%        | 0,256       |
| <b>1,59</b> | <b>3,2</b> | <b>0,0</b>            | <b>1,7</b>  | <b>96,7%</b> | 0,11        | 0,0                   | 0,30        | 0,5%         | 0,595       |
| <b>6,3</b>  | <b>3,8</b> | <b>0,0</b>            | <b>1,87</b> | <b>96,0%</b> | 0,12        | 0,0                   | 2,67        | 92,9%        | 0,16        |
| <b>15,9</b> | <b>4,2</b> | <b>0,0</b>            | <b>1,97</b> | <b>95,7%</b> | <b>0,12</b> | <b>0,0</b>            | <b>2,48</b> | <b>95,0%</b> | <b>0,13</b> |
| <b>50,2</b> | <b>4,7</b> | 0,0                   | 1,4         | 82,0%        | <b>0,25</b> | <b>0,0</b>            | <b>2,23</b> | <b>98,2%</b> | <b>0,08</b> |
| 159         | 5,2        | 0,0                   | 0,00        | 0,0%         | 0,60        | 0,0                   | 1,08        | 92,8%        | 0,16        |
| 843,4       | 6,0        | 0,0                   | 0,7         | 65,5%        | 0,35        | 0,0                   | 0,07        | 39,2%        | 0,47        |

Tal como puede observarse a partir de los datos de la tabla IV, tanto la parte real como la imaginaria de la impedancia pueden correlacionarse con la concentración de IgG de una suspensión de fracción II+III. Además, puede determinarse la parte real o imaginaria de la impedancia y compararse con un valor de impedancia de referencia para determinar la concentración de IgG en una suspensión de fracción II+III.

25

Preferiblemente, el intervalo de frecuencias usado para las mediciones de impedancia debe encontrarse dentro de los intervalos de frecuencia óptimos enumerados en la tabla V.

30

Tabla V

| Impedancia | Intervalo de frecuencias óptimo                    |
|------------|--|
| Re Z       | de aproximadamente 1,6 kHz a aproximadamente 16kHz |
| Im Z       | de aproximadamente 16 kHz a aproximadamente 50 kHz |

35

Ejemplo VII

Se correlacionó la impedancia (Re Z y/o Im Z) de un fluido biológico con la concentración de inmunoglobulina G humana (IgG) a intervalos de frecuencias definidos durante tanto un procedimiento de filtración como uno de lavado posterior. Se suspendió una pasta de fracción II+III en una composición de tampón de extracción. Los 1,6 l de la suspensión estaban contenidos en un tanque de proceso con camisa de 10 litros con baño de agua para el control de la temperatura y se utilizó en los procedimientos de filtración y lavado posterior.

Se recogió una muestra de volumen de 1 l en cada una de las etapas de procedimiento (F1, F2, PW1, PW2, PW3) y se midió en cada una la concentración de IgG así como Re Z e Im Z. Los resultados se muestran en la tabla VI a continuación, con los valores de IgG centrada frente a promedio calculados según la ecuación 7. El valor de IgG centrada frente a promedio en cada etapa de procedimiento se muestra gráficamente en la figura 12.

Tabla VI

| Etapas de procedimiento  | IgG mg/dl | IgG centrada frente a promedio |
|--------------------------|-----------|--------------------------------|
| Filtrado 1 (F1)          | 25,3      | -0,87                          |
| Filtrado 2 (F2)          | 539       | 1,68                           |
| Lavado posterior 1 (PW1) | 359       | 0,78                           |
| Lavado posterior 2 (PW2) | 72,4      | -0,64                          |
| Lavado posterior 3 (PW3) | 10,2      | -0,95                          |

Se midieron las partes real (Re Z) e imaginaria (Im Z) de la impedancia de cada muestra a frecuencias (f), que se determinó previamente que permitían una fuerte correlación de la señal de impedancia respectiva con la concentración de IgG. Se tomaron las mediciones de Re Z a una frecuencia de 0,63 kHz ( $\log(f) = 2,8$ ) y se calcularon los valores centrados frente a promedio según la ecuación 9 y se muestran gráficamente en la figura 13. Se tomaron las mediciones de Im Z a una frecuencia de 16 kHz ( $\log(f) = 4,2$ ) y se calcularon los valores centrados frente a promedio según la ecuación 11 y se muestran gráficamente en la figura 14. La tabla VII, a continuación, indica los resultados de las mediciones y adicionalmente incluye los valores de  $\Delta\text{Im Z}$  centrada frente a promedio y  $\Delta\text{Re Z}$  centrada frente a promedio calculados.

Tabla VII

| Etapas de procedimiento | Re Z f= 0,63 kHz | Im Z f= 16 kHz | $\Delta\text{Re Z f= 0,63 kHz}$ | $\Delta\text{Im Z f= 16 kHz}$ | $\Delta\text{Re Z cent. frente a prom. f= 0,63 kHz}$ | $\Delta\text{Im Z cent. frente a prom. f= 16 kHz}$ |
|-------------------------|------------------|----------------|---------------------------------|-------------------------------|--|--|
| Tampón                  | -41,24           | -3,87          |                                 |                               |  |  |
| F1                      | -49,40           | -10,87         | -8,17                           | -8,17                         | -8,17  | 0,43   |
| F2                      | -31,16           | -5,17          | 10,08                           | 10,08                         | 10,08  | -0,73  |
| PW1                     | -39,20           | -7,40          | 2,04                            | 2,04                          | 2,04   | -0,28  |
| PW2                     | -49,93           | -9,37          | -8,70                           | -8,70                         | -8,70  | 0,12   |
| PW3                     | -54,76           | -11,07         | -13,52                          | -13,52                        | -13,52   | 0,47   |

Se usó el software informático Minitab 15.1.1.0 para establecer los intervalos de frecuencia óptimos en donde la correlación entre las partes real e imaginaria de la impedancia ( $\Delta\text{Re Z}$  y  $\Delta\text{Im Z}$ ) y la característica medida ( $\Delta\text{IgG}$ ) es la más fuerte. Se determinaron las ecuaciones de regresión según las ecuaciones 12 y 13 anteriores, y los coeficientes A, B, A', B' así como los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) correspondientes, y se presentan los errores estándar de la regresión (S) a diferentes frecuencias en la tabla VIII. Se definieron entonces los intervalos de frecuencia óptimos de 0,63, 6,3 y 15,9 (mostrados a continuación en negrita) como aquellos en los que el  $R^2 \geq 95\%$  para o bien  $\Delta\text{Re Z}$  o bien  $\Delta\text{Im Z}$ , y S es mínimo.

Tabla VIII

| f (kHz)     | Log (f)    | $\Delta\text{Re Z}$ |              |              |             | $\Delta\text{Im Z}$ |              |              |             |
|-------------|------------|---------------------|--------------|--------------|-------------|---------------------|--------------|--------------|-------------|
|             |            | A                   | B            | $R^2$        | S           | A'                  | B'           | $R^2$        | S           |
| 0,02        | 1,3        | 0,0                 | 0,5          | 29,9%        | 1,13        | 0,0                 | -0,04        | 3,6%         | 1,33        |
| 0,05        | 1,7        | 0,0                 | 0,1          | 0,7%         | 1,35        | 0,0                 | -0,02        | 3,4%         | 1,33        |
| 0,1         | 2,0        | -1,9                | -1,9         | 67,9%        | 0,77        | -0,37               | -0,11        | 89,7%        | 0,44        |
| <b>0,63</b> | <b>2,8</b> | <b>0,0</b>          | <b>-0,4</b>  | <b>96,8%</b> | <b>0,24</b> | 0,0                 | 0,42         | 66,6%        | 0,78        |
| 1,59        | 3,2        | 0,0                 | -0,14        | 71,1%        | 0,73        | 0,0                 | -0,21        | 1,2%         | 1,35        |
| <b>6,3</b>  | <b>3,8</b> | <b>0,0</b>          | <b>-0,36</b> | <b>94,9%</b> | <b>0,31</b> | 0,0                 | -2,36        | 88,9%        | 0,45        |
| <b>15,9</b> | <b>4,2</b> | <b>0,0</b>          | <b>-0,34</b> | <b>96,7%</b> | <b>0,25</b> | <b>0,0</b>          | <b>-2,27</b> | <b>96,8%</b> | <b>0,24</b> |
| 50,2        | 4,7        | 0,0                 | -0,13        | 11,0%        | 1,28        | 0,0                 | 0,85         | 8,1%         | 1,30        |
| 159         | 5,2        | 0,0                 | 2,71         | 77,6%        | 0,64        | 0,0                 | -1,64        | 93,5%        | 0,35        |
| 251,8       | 5,4        | 0,0                 | -4,9         | 41,0%        | 1,04        | 0,0                 | -1,33        | 43,9%        | 1,02        |
| 399,1       | 5,6        | 0,0                 | -3,00        | 21,7%        | 1,19        | 0,0                 | 0,34         | 49,3%        | 0,97        |

|       |     |     |       |       |      |     |      |      |      |
|-------|-----|-----|-------|-------|------|-----|------|------|------|
| 843,4 | 6,0 | 0,0 | -2,29 | 35,9% | 1,09 | 0,0 | 0,91 | 1,4% | 1,35 |
|-------|-----|-----|-------|-------|------|-----|------|------|------|

Tal como se muestra en las tablas VII y VIII, las partes tanto real como/o imaginaria de la impedancia pueden emplearse para el control y/o la monitorización de la concentración de IgG durante etapas de procedimiento de filtración y/o lavado posterior de suspensiones de pasta de fracción II+III. Las mediciones de impedancia pueden correlacionarse con los datos proporcionados en el presente documento para extrapolar la concentración de IgG durante las etapas de procedimiento de filtración y/o lavado posterior de pasta de fracción II+III. Según los datos proporcionados en el presente documento, los intervalos de frecuencia óptimos para medir las concentraciones de IgG se muestran en la tabla IX.

Tabla IX

| Impedancia | Intervalo de frecuencias óptimo                     |
|------------|---|
| Re Z       | aproximadamente 0,6 kHz                             |
|            | de aproximadamente 1,6 kHz a aproximadamente 16 kHz |
| Im Z       | aproximadamente 16 kHz                              |

Ejemplo VIII

En una realización a modo de ejemplo, se midieron intervalos de valores de impedancia de referencia para una disolución de albúmina al 5% en volumen a varias frecuencias y concentraciones de alcohol diferentes. Se añadió por incrementos una disolución de etanol al 95% en volumen a una disolución de 1,6 kg de agua y 0,4 kg de albúmina en un tanque con camisa de 10 l en un baño de agua. Se añadió la disolución de etanol a una temperatura de -1°C. Se tomaron múltiples mediciones de impedancia a varias frecuencias y se almacenaron en un ordenador de uso general cuando la disolución alcanzó el 5% de etanol en volumen. Se repitieron estas etapas al 10% de etanol en volumen, el 15% de etanol en volumen, el 20% de etanol en volumen, el 25% de etanol en volumen y el 30% de etanol en volumen. Se representaron gráficamente los valores de impedancia de referencia y se compararon para determinar el efecto de la concentración de alcohol sobre la impedancia de la disolución de albúmina.

En la figura 16 se muestra el gráfico de Nyquist resultante, en el que la parte real de la impedancia 1610 se representa gráficamente frente a la parte imaginaria de la impedancia 1620 de la disolución a múltiples frecuencias 1630 que oscilan entre 1KHz y 2MHz y múltiples concentraciones 1640 de alcohol que oscilan entre el 5% en volumen y el 30% en volumen. Las partes real 1610 e imaginaria 1620 de la impedancia pueden determinarse a cualquiera de varias frecuencias 1630 entre 1 KHz y 2 MHz y los valores de impedancia medidos pueden almacenarse en, por ejemplo, una base de datos en un ordenador de uso general para su comparación con valores de impedancia medidos. Por ejemplo, puede usarse el gráfico de Nyquist de la figura 16 para extrapolar una concentración de alcohol en una disolución de muestra, que tiene por lo demás la misma composición o similar, basándose en mediciones de impedancia de una disolución de este tipo a frecuencias que oscilan entre 1KHz y 2 MHz. Se contempla que los valores de impedancia de cualquier disolución que contenga alcohol pueden correlacionarse usando un gráfico de Nyquist similar al mostrado en la figura 16.

También se determinaron intervalos de frecuencia óptimos para correlacionar la concentración de alcohol con la parte real de la impedancia a concentraciones de etanol variables. Se midió la parte real de la impedancia (Re Z) a cada una de las concentraciones de alcohol mostradas en la tabla X usando un medidor de LCR de precisión 4989 de Agilent que tenía un sensor de conductividad esterilizable modelo TB457 de ABB unido al mismo.

Tabla X

| Concentración de alcohol, % en volumen | Re Z f = 0,63 kHz | $\Delta$ Re Z f = 0,63 kHz | $\Delta$ Re Z cent. frente a prom. f = 0,63 kHz |
|--|-------------------|----------------------------|---|
| 0                                      | -208              |                            |   |
| 5                                      | -292              | -83,6                      | 0,209   |
| 10                                     | -380              | -171                       | 0,427   |
| 15                                     | -569              | -360                       | 0,897   |
| 20                                     | -679              | -471                       | 1,17  |
| 25                                     | -853              | -645                       | 1,61  |
| 30                                     | -885              | -676                       | 1,69  |

Se calcularon  $\Delta$ Re Z y  $\Delta$ Re Z centrada frente a promedio mostradas en la tabla X usando las ecuaciones 14 y 15 y se muestran gráficamente en la figura 15.

*Ecuación 14*

$$\Delta \text{Re Z} = \text{Re Z} - \text{Re Z}_0, \text{ en donde } \text{Re Z}_0 = \text{Re Z al } 0\% \text{ de alcohol}$$

Ecuación 15

$$\Delta\text{Re Z centrada frente a promedio} = \frac{\Delta\text{Re Z} - \overline{\Delta\text{Re Z}}}{\overline{\Delta\text{Re Z}}}$$

5 Se usó el software informático Minitab 15.1.1.0 para establecer los intervalos de frecuencia óptimos en donde la correlación entre la  $\Delta\text{Re Z}$  y la concentración de alcohol (AC) es la más fuerte. Se determinó una ecuación de regresión lineal según la ecuación 10 y se presentan los coeficientes A, B así como los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) correspondientes y los errores estándar de la regresión (S) a diferentes frecuencias en la tabla XI. Se definieron los intervalos de frecuencia óptimos de 0,02, 0,63, 1,59, 6,3, 15,9 y 843,4 (mostrados a  
10 continuación en negrita) como aquellos en los que el  $R^2 \geq 95\%$  para  $\Delta\text{Re Z}$  y S es mínimo.

Tabla XI

| f (kHz)      | Log(f)     | $\Delta\text{Re Z}$ |              |              |             |
|--------------|------------|---------------------|--------------|--------------|-------------|
|              |            | A                   | B            | $R^2$        | S           |
| <b>0,02</b>  | <b>1,3</b> | <b>18,65</b>        | <b>16,14</b> | <b>96,0%</b> | <b>1,8</b>  |
| 0,05         | 1,7        | 16,38               | 6,13         | 68,5%        | 5,1         |
| 0,1          | 2,0        | 17,39               | 11,27        | 80,1%        | 4,1         |
| <b>0,63</b>  | <b>2,8</b> | <b>2,96</b>         | <b>13,95</b> | <b>98,9%</b> | <b>0,96</b> |
| <b>1,59</b>  | <b>3,2</b> | <b>2,48</b>         | <b>14,50</b> | <b>98,1%</b> | <b>1,26</b> |
| <b>6,3</b>   | <b>3,8</b> | <b>2,57</b>         | <b>14,38</b> | <b>98,1%</b> | <b>1,26</b> |
| <b>15,9</b>  | <b>4,2</b> | <b>1,32</b>         | <b>15,27</b> | <b>98,2</b>  | <b>1,23</b> |
| 50,2         | 4,7        | 18,54               | -0,85        | 45,8%        | 6,7         |
| 159          | 5,2        | -6,54               | 22,50        | 91,3         | 2,69        |
| <b>843,4</b> | <b>6,0</b> | <b>-19,39</b>       | <b>36,40</b> | <b>97,6</b>  | <b>1,47</b> |

15 Tal como se muestra en las tablas X y XI, la parte real de la impedancia puede emplearse para la monitorización y/o el control de la concentración de alcohol durante la adición de alcohol a disoluciones que contienen albúmina. Los intervalos de frecuencia óptimos encontrados para medir la adición de alcohol a disoluciones que contienen albúmina se muestran en la tabla XII.

20

Tabla XII

| Impedancia | Intervalo de frecuencias óptimo                      |
|------------|--|
| Re Z       | aproximadamente 0,02 kHz                             |
|            | de aproximadamente 0,63 kHz a aproximadamente 16 kHz |
|            | aproximadamente 843 kHz                              |

Ejemplo IX

25 Se correlacionó la impedancia compleja con la concentración de alcohol de un plasma crioempobrecido a determinadas frecuencias durante un procedimiento de adición de alcohol. Se añadió por incrementos una disolución de etanol al 95% en volumen a una disolución de 4,24 g de ácido acético 5 M y 3,43 kg de plasma crioempobrecido en un tanque con camisa de 10 l en un baño de agua. Se añadieron aproximadamente 0,237 kg de la disolución de etanol a lo largo de un periodo de 1,5 horas a una temperatura de -2°C para producir una mezcla de alcohol al 8%  
30 en volumen. Adicionalmente, se añadieron 0,018 kg de un tampón. Se determinó la parte real de la impedancia a cada concentración de alcohol mostrada en la tabla XIII usando un medidor de LCR de precisión 4989 de Agilent que tenía un sensor de conductividad esterilizable modelo TB457 de ABB unido al mismo. Además, se aumentó la concentración de alcohol desde el 8% hasta el 20% en volumen a lo largo de 5 horas adicionales y se tomaron mediciones de impedancia adicionales.

35

Tabla XIII

| Concentración de alcohol, % en volumen | Re Z<br>f = 0,63 kHz | $\Delta\text{Re Z}$<br>f = 0,63 kHz | $\Delta\text{Re Z}$ cent. frente a prom. f = 0,63 kHz |
|--|----------------------|-------------------------------------|---|
| 0                                      | -31,90               |                                     |   |
| 1,2                                    | -33,97               | -2,063                              | -0,9289   |
| 2,4                                    | -38,68               | -6,77                               | -0,7666   |
| 5,1                                    | -45,71               | -13,81                              | -0,5241   |
| 6,5                                    | -47,82               | -15,91                              | -0,4516   |
| 8,4                                    | -52,48               | -20,57                              | -0,2910   |

|      |        |        |        |
|------|--------|--------|--------|
| 11,5 | -60,99 | -29,08 | 0,0023 |
| 14,7 | -70,78 | -38,87 | 0,3398 |
| 17,5 | -81,93 | -50,02 | 0,7243 |
| 20,3 | -85,34 | -53,43 | 0,8417 |
| 21,8 | -91,54 | -59,63 | 1,0556 |

Se calcularon la  $\Delta Re Z$  y  $\Delta Re Z$  centrada frente a promedio mostradas en la tabla XIII usando las ecuaciones 14 y 15 y se muestran gráficamente en la figura 17.

- 5 Se usó el software informático Minitab 15.1.1.0 para establecer los intervalos de frecuencia óptimos en donde la correlación entre la  $\Delta Re Z$  y la concentración de alcohol (AC) es la más fuerte. Se determinó una ecuación de regresión lineal según la ecuación 12 y se presentan los coeficientes A, B así como los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) correspondientes y los errores estándar de la regresión (S) a diferentes frecuencias en la tabla XIV. Se definieron los intervalos de frecuencia óptimos de 0,05, 0,1, 1,59, 6,3, 15,9, 50,2 y 159 (mostrados a
- 10 continuación en negrita) como aquellos en los que el  $R^2 \geq 95\%$  para  $\Delta Re Z$  y S es mínimo.

Tabla XIV

| f (kHz)     | Log (f)    | $\Delta Re Z$ |              |              |             |
|-------------|------------|---------------|--------------|--------------|-------------|
|             |            | A             | B            | $R^2$        | S           |
| 0,02        | 1,3        | 10,94         | 13,15        | 83,4%        | 3,18        |
| <b>0,05</b> | <b>1,7</b> | <b>10,94</b>  | <b>8,50</b>  | <b>97,1%</b> | <b>1,32</b> |
| <b>0,1</b>  | <b>2,0</b> | <b>10,93</b>  | <b>10,97</b> | <b>98,9%</b> | <b>0,84</b> |
| 0,63        | 2,8        | 10,94         | 9,85         | 83,8%        | 3,15        |
| <b>1,59</b> | <b>3,2</b> | <b>10,92</b>  | <b>11,07</b> | <b>99,5%</b> | <b>0,57</b> |
| <b>6,3</b>  | <b>3,8</b> | <b>10,94</b>  | <b>10,60</b> | <b>99,5%</b> | <b>0,58</b> |
| <b>15,9</b> | <b>4,2</b> | <b>10,94</b>  | <b>10,45</b> | <b>99,5%</b> | <b>0,55</b> |
| <b>50,2</b> | <b>4,7</b> | <b>10,94</b>  | <b>10,77</b> | <b>99,5%</b> | <b>0,58</b> |
| <b>159</b>  | <b>5,2</b> | <b>10,94</b>  | <b>12,09</b> | <b>97,4%</b> | <b>1,25</b> |
| 843,4       | 6,0        | 10,94         | 2,25         | 63,0%        | 4,77        |

- 15 Tal como se muestra en los datos proporcionados en las tablas XVII y XIV, se encontró que la impedancia puede usarse para monitorizar y/o controlar la concentración de alcohol durante la adición de alcohol a una disolución de plasma crioempobrecido. Los intervalos de frecuencia óptimos encontrados para medir la adición de alcohol a una disolución de plasma crioempobrecido se muestran en la tabla XV.

20 Tabla XV

| Impedancia | Intervalo de frecuencias óptimo                      |
|------------|--|
| Re Z       | aproximadamente 0,02 kHz                             |
|            | de aproximadamente 0,63 kHz a aproximadamente 16 kHz |
|            | aproximadamente 843 kHz                              |

- 25 La invención descrita y reivindicada en el presente documento no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas divulgadas en el presente documento puesto que estas realizaciones están previstas como ilustraciones de varios aspectos de esta invención. Se pretende que cualquier realización equivalente esté dentro del alcance de esta invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. También se pretende que tales modificaciones se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para separar una proteína de un fluido biológico hasta un grado seleccionado como objetivo, comprendiendo el método:
 

5                   ajustar un parámetro de dicho fluido biológico para modificar la solubilidad de dicha proteína en dicho fluido biológico, seleccionándose dicho fluido biológico del grupo que consiste en un plasma sanguíneo y un producto intermedio de plasma fraccionado, y seleccionándose dicho parámetro del grupo que consiste en concentración de solutos, concentración de disolvente, pH, fuerza iónica, temperatura, densidad, velocidad de flujo y viscosidad;

10                   monitorizar la impedancia del fluido biológico durante dicha etapa de ajuste;

15                   comparar dicha impedancia con un valor de impedancia objetivo correspondiente a un grado objetivo de separación de dicha proteína de dicho fluido biológico; y

20                   provocar un aumento o una disminución en la solubilidad de dicha proteína en dicho fluido biológico modificando adicionalmente dicho parámetro cuando dicha impedancia se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en más de una tolerancia aceptable para llevar dicho valor de impedancia dentro de dicha tolerancia aceptable de dicho valor de impedancia objetivo;

                      efectuando de ese modo la separación hasta dicho grado seleccionado como objetivo.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el producto de plasma fraccionado se selecciona del grupo que consiste en albúmina, inhibidor de alfa 1-proteinasa, factor antihemofílico, complejo de factor de von Willebrand, complejo coagulante anti-inhibidor, antitrombina, inhibidor de esterasa C1, factores de coagulación, fibrina, fibrinógeno, inmunoglobulina, concentrado de proteína C y trombina.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha etapa de modificación comprende modificar adicionalmente dicho parámetro cuando dicha impedancia se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en al menos el 0,5%.
4. Método según la reivindicación 3, en el que dicha etapa de modificación comprende modificar adicionalmente dicho parámetro cuando dicha impedancia se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en al menos el 1,0%.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha etapa de modificación comprende modificar adicionalmente dicho parámetro cuando dicha impedancia se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en al menos el 5%.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de modificación comprende proporcionar una notificación a un operario cuando dicha impedancia se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de modificación comprende además desencadenar un análisis de dicho fluido biológico cuando dicha impedancia se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de modificación comprende:
 

50                   determinar una cantidad de modificación de dicho parámetro necesaria para provocar que la impedancia de dicho fluido biológico esté en o aproximadamente en dicho valor de impedancia objetivo cuando dicha impedancia se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable; y

55                   modificar el parámetro en dicha cantidad de modificación.
9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicha etapa de modificación comprende modificar automáticamente dicho parámetro cuando dicha impedancia se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable.
10. Método según la reivindicación 9, en el que dicha etapa de modificación se realiza sustancialmente en tiempo real.
11. Método para controlar un procedimiento de separación de proteínas para separar una proteína de un fluido biológico, comprendiendo dicho método:

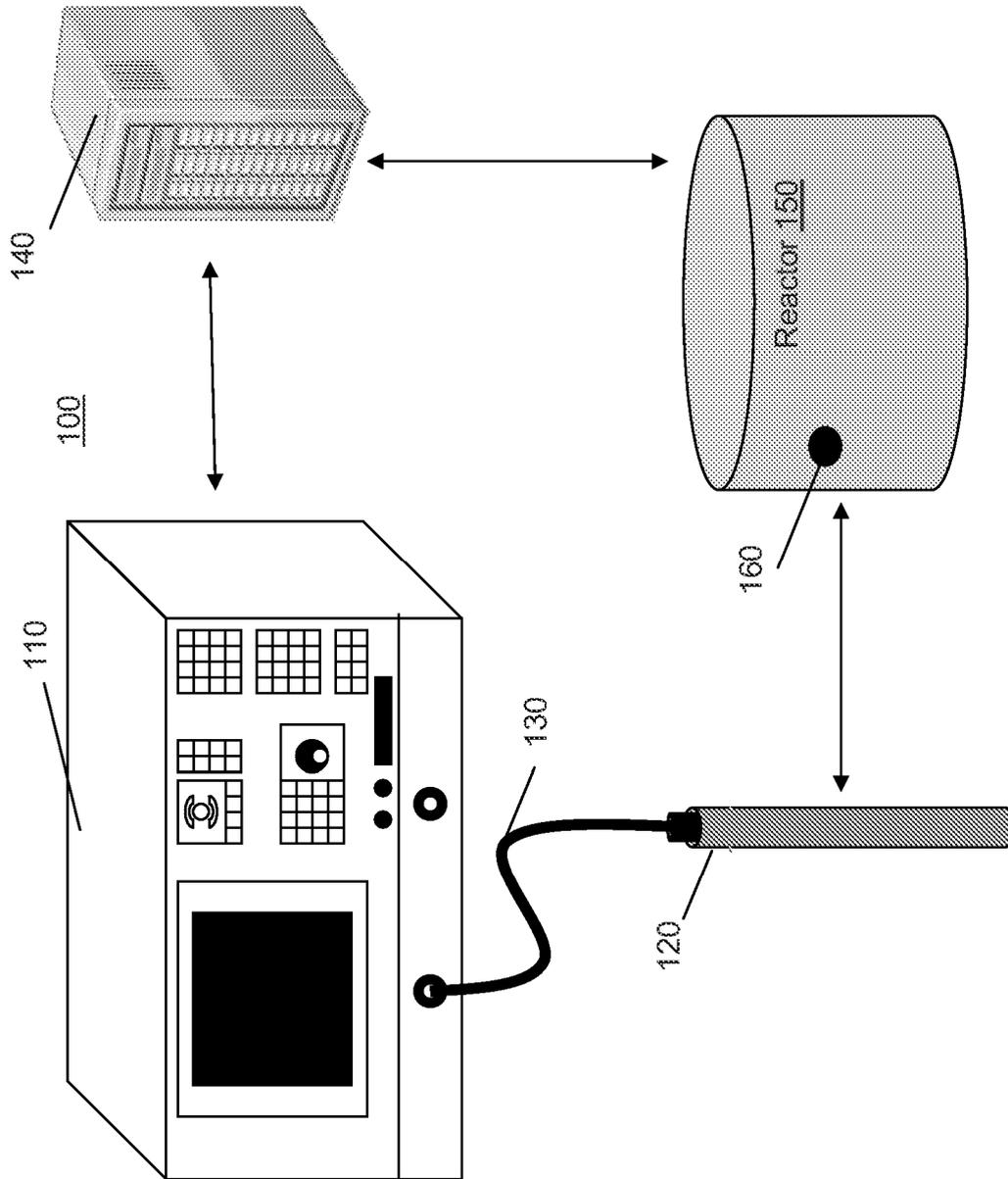
obtener una medición de impedancia de dicho fluido biológico de una etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas, seleccionándose dicho fluido biológico del grupo que consiste en un plasma sanguíneo y un producto intermedio de plasma fraccionado;

5 determinar una cantidad de modificación de un parámetro de dicho fluido biológico que modifica la solubilidad de dicha proteína en dicho fluido biológico necesaria para provocar que la medición de impedancia de dicho fluido biológico esté dentro de una tolerancia aceptable de un valor de impedancia objetivo, seleccionándose dicho parámetro del grupo que consiste en concentración de solutos,  
10 concentración de disolvente, pH, fuerza iónica, temperatura, densidad, velocidad de flujo y viscosidad; y

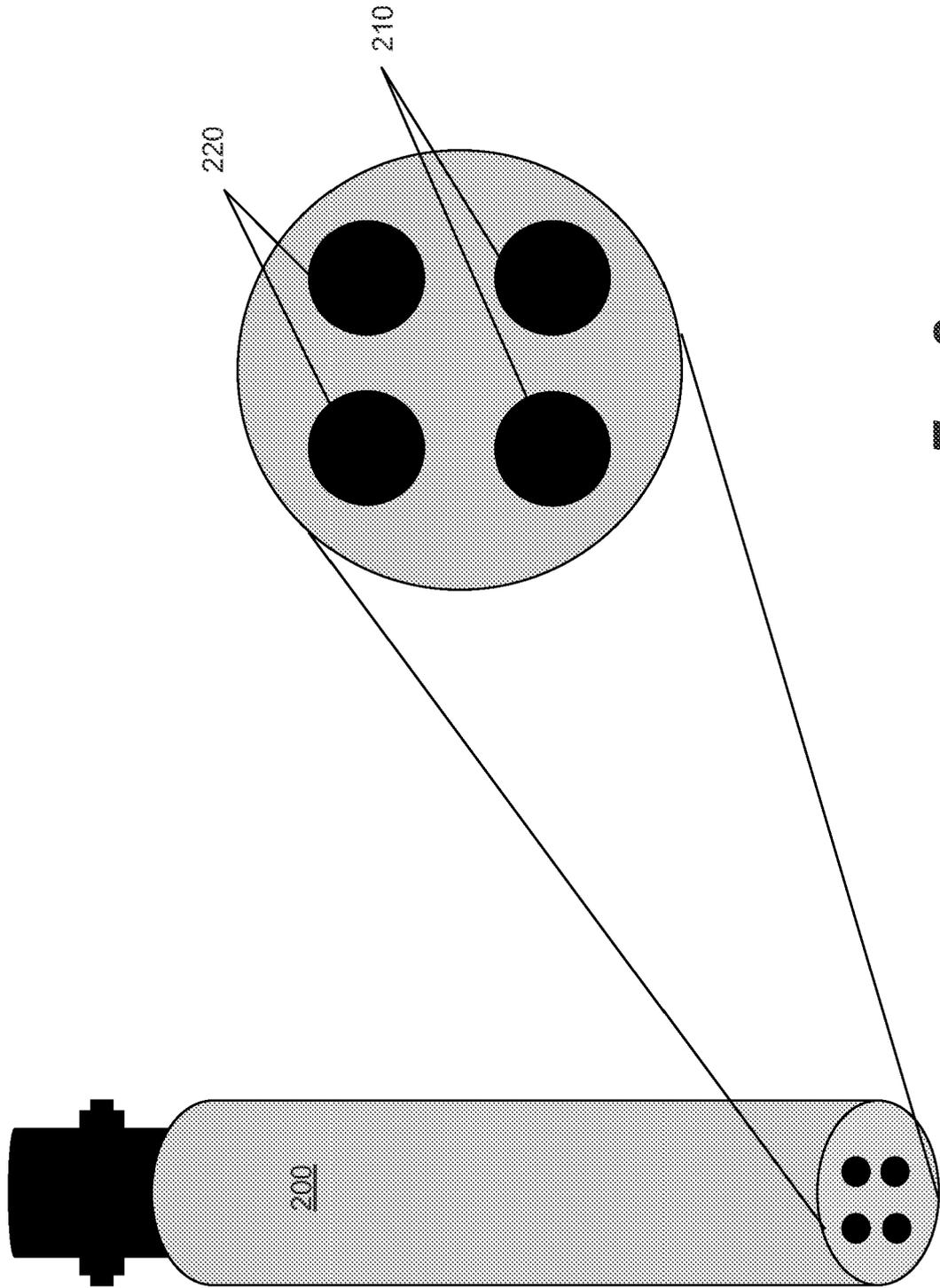
provocar un aumento o una disminución en la solubilidad de dicha proteína en dicho fluido biológico ajustando dicho parámetro que modifica la solubilidad de dicha proteína en dicho fluido biológico en dicha cantidad de modificación para llevar dicho valor de impedancia dentro de dicha tolerancia aceptable de dicho valor de impedancia objetivo;

controlando de ese modo dicho procedimiento de separación de proteínas.

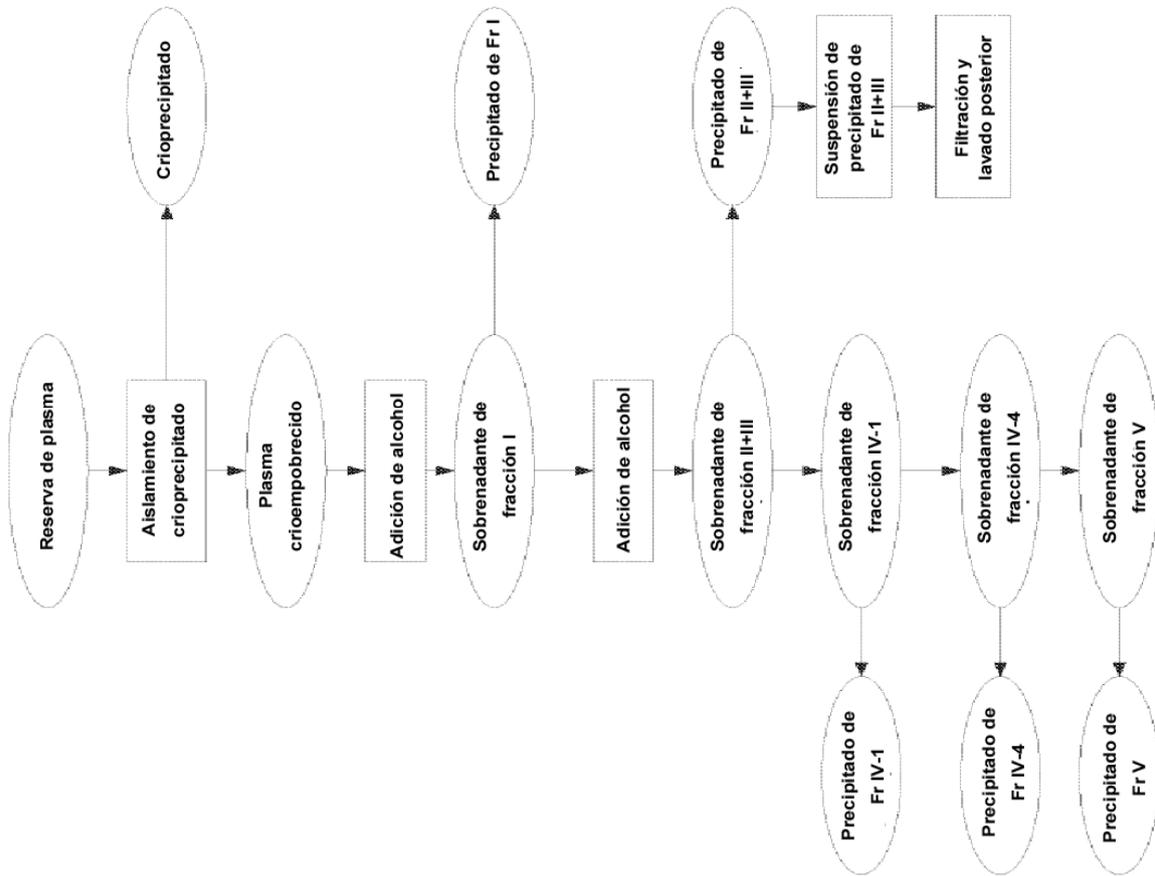
12. Método según la reivindicación 11, caracterizado además porque dicha etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas comprende precipitar dicha proteína de dicho fluido biológico.
13. Método según la reivindicación 11, caracterizado además porque dicha etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas comprende purificar o concentrar dicha proteína.
14. Método según la reivindicación 11, caracterizado además porque dicha etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas comprende un procedimiento de flujo continuo y dicho fluido biológico es un fluido biológico en línea de dicho procedimiento de flujo continuo.
15. Método según la reivindicación 11, caracterizado además porque dicha etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas comprende un procedimiento discontinuo y dicho fluido biológico es una mezcla discontinua de dicho procedimiento discontinuo.
16. Método según la reivindicación 11, caracterizado además porque dicha etapa de dicho procedimiento de separación de proteínas comprende un procedimiento de filtración.
17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-16, caracterizado además porque dicha etapa de determinación comprende proporcionar una notificación a un operario cuando dicha medición se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable.
18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-17, caracterizado además porque dicha etapa de ajuste comprende desencadenar un análisis de dicho fluido biológico cuando dicha medición se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable.
19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-17, caracterizado además porque dicha etapa de ajuste comprende ajustar automáticamente dicho parámetro cuando dicha medición se desvía de dicho valor de impedancia objetivo en más de dicha tolerancia aceptable.
20. Método según la reivindicación 19, en el que dicha etapa de ajuste se realiza sustancialmente en tiempo real.
21. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 11-20, caracterizado además porque el producto de plasma fraccionado se selecciona del grupo que consiste en albúmina, inhibidor de alfa1-proteinasa, factor antihemofílico, complejo de factor de von Willebrand, complejo coagulante anti-inhibidor, antitrombina, inhibidor de esterasa C1, factores de coagulación, fibrina, fibrinógeno, inmunoglobulinas, concentrado de proteína C y trombina.
22. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fluido biológico se usa en una cantidad de 1,6 l a 10 l.
23. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-21, en el que la separación de proteínas se realiza a gran escala.



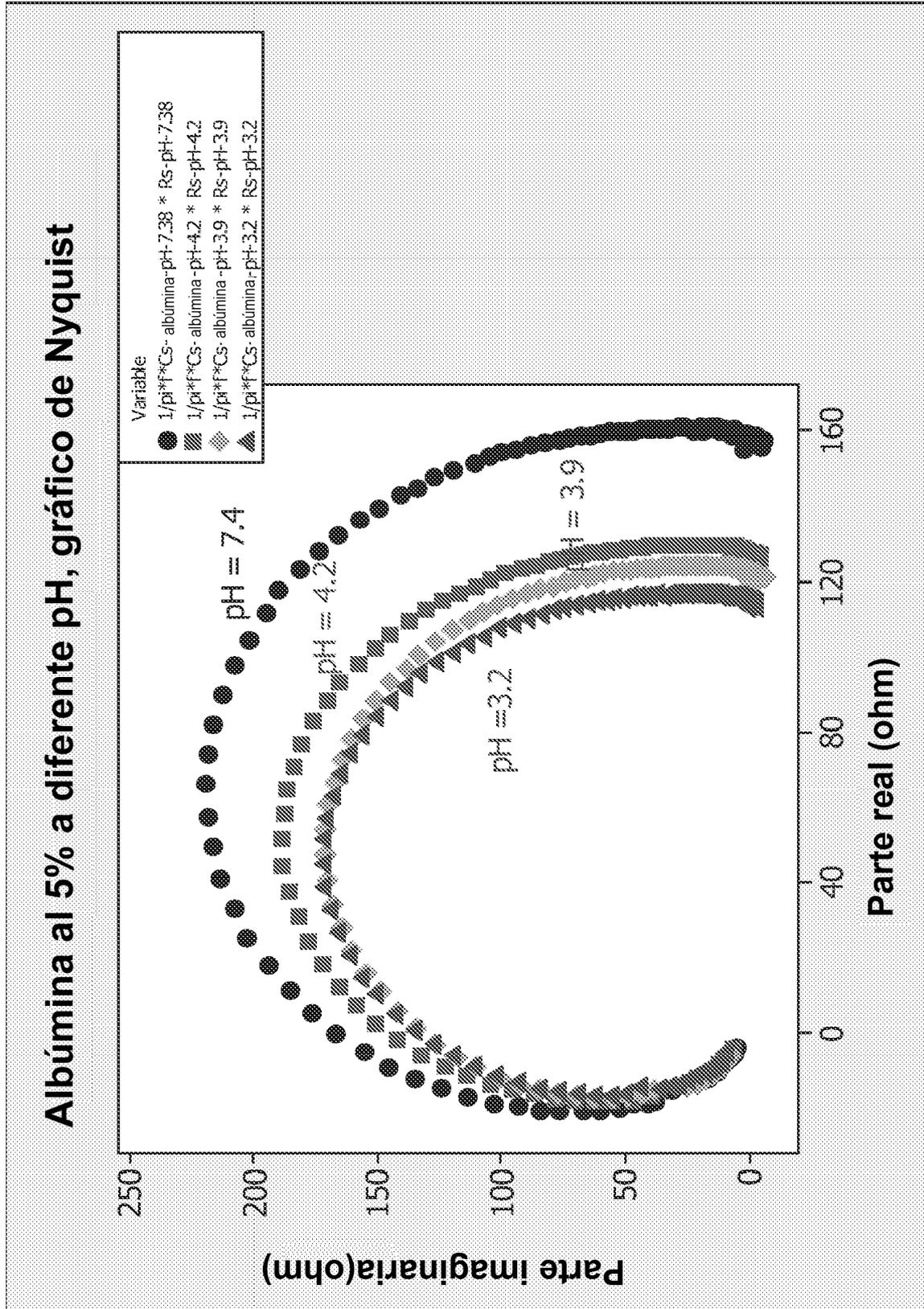
**FIG. 1**



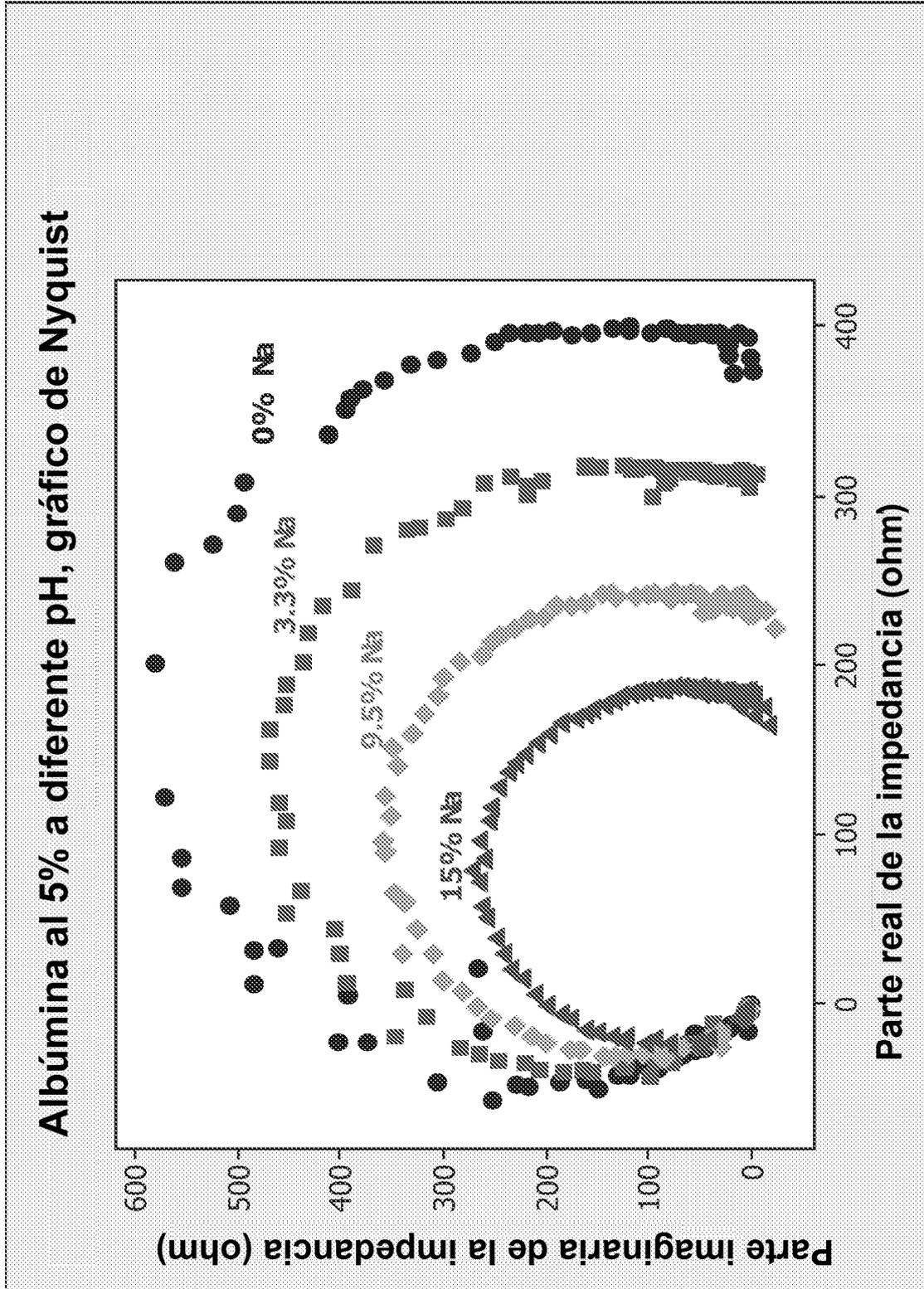
**FIG. 2**



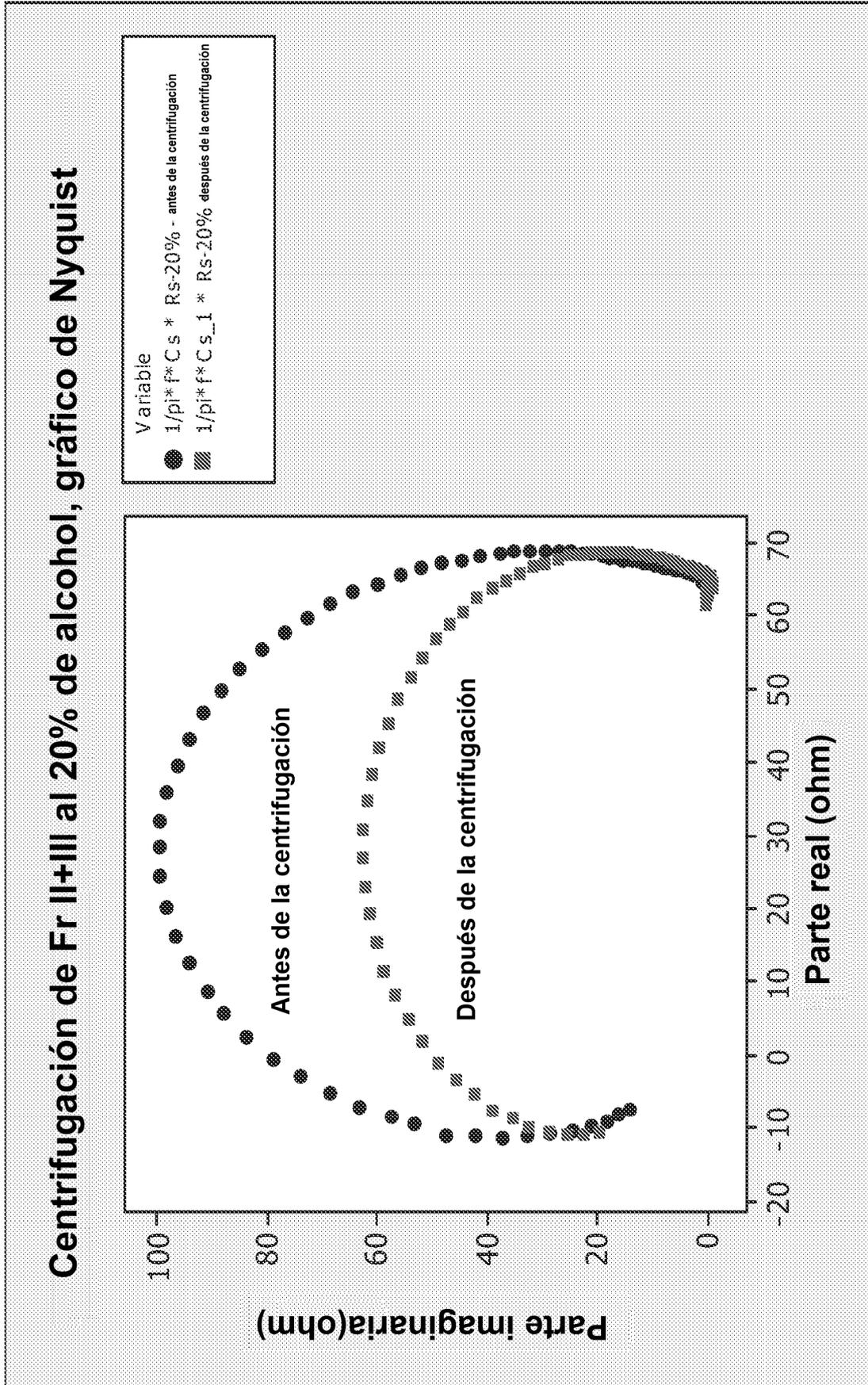
**FIG. 3**



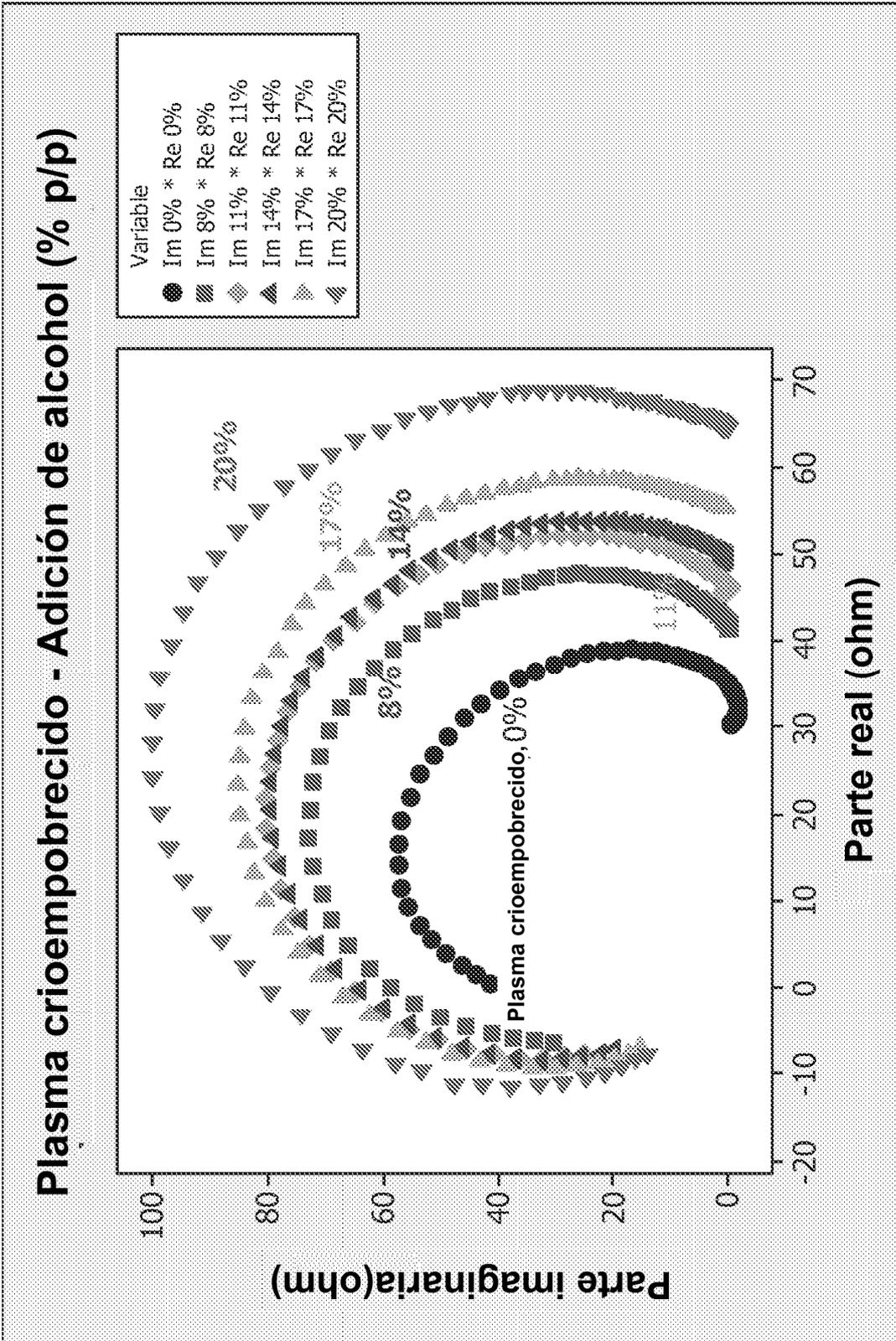
**FIG. 4**



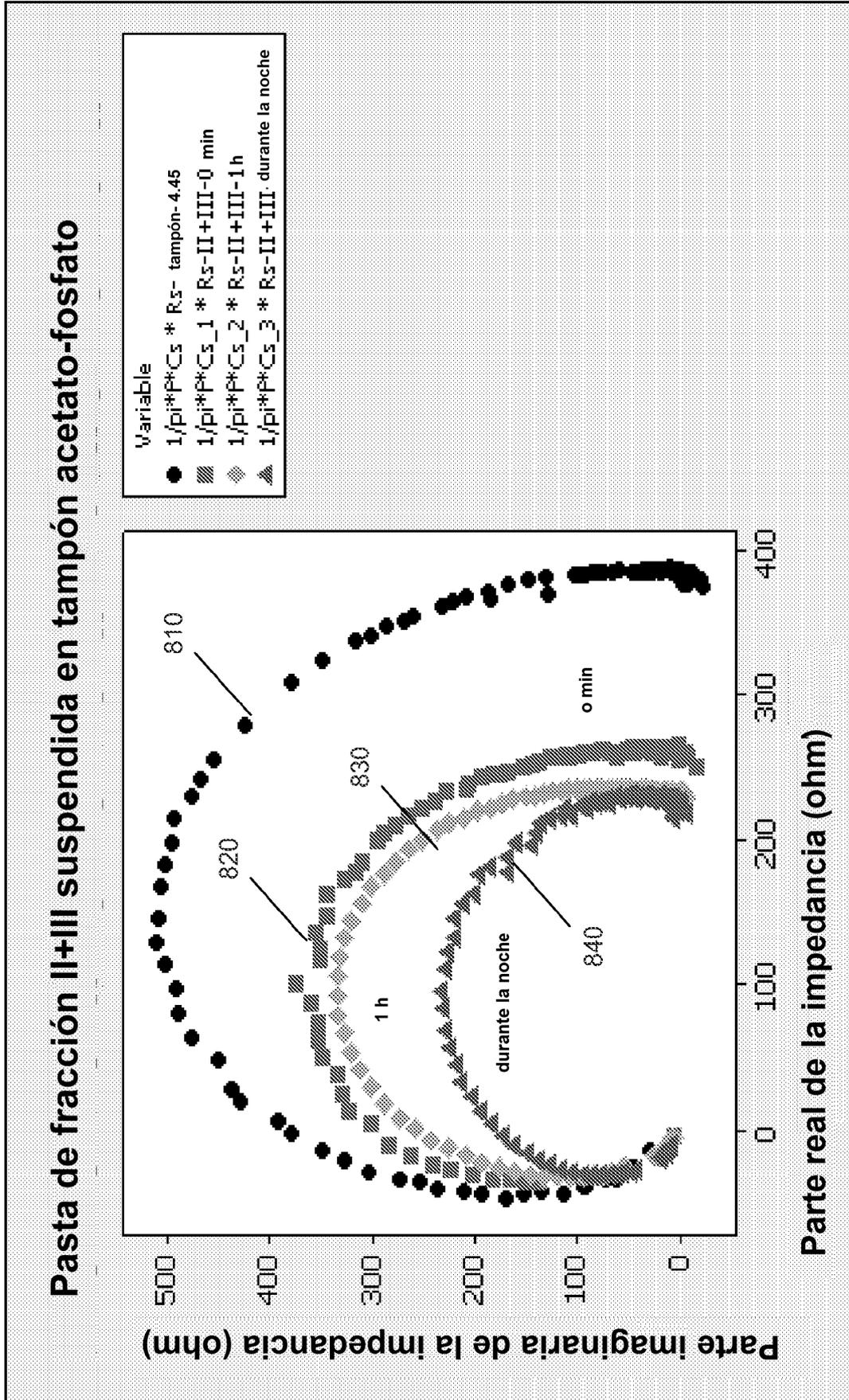
**FIG. 5**



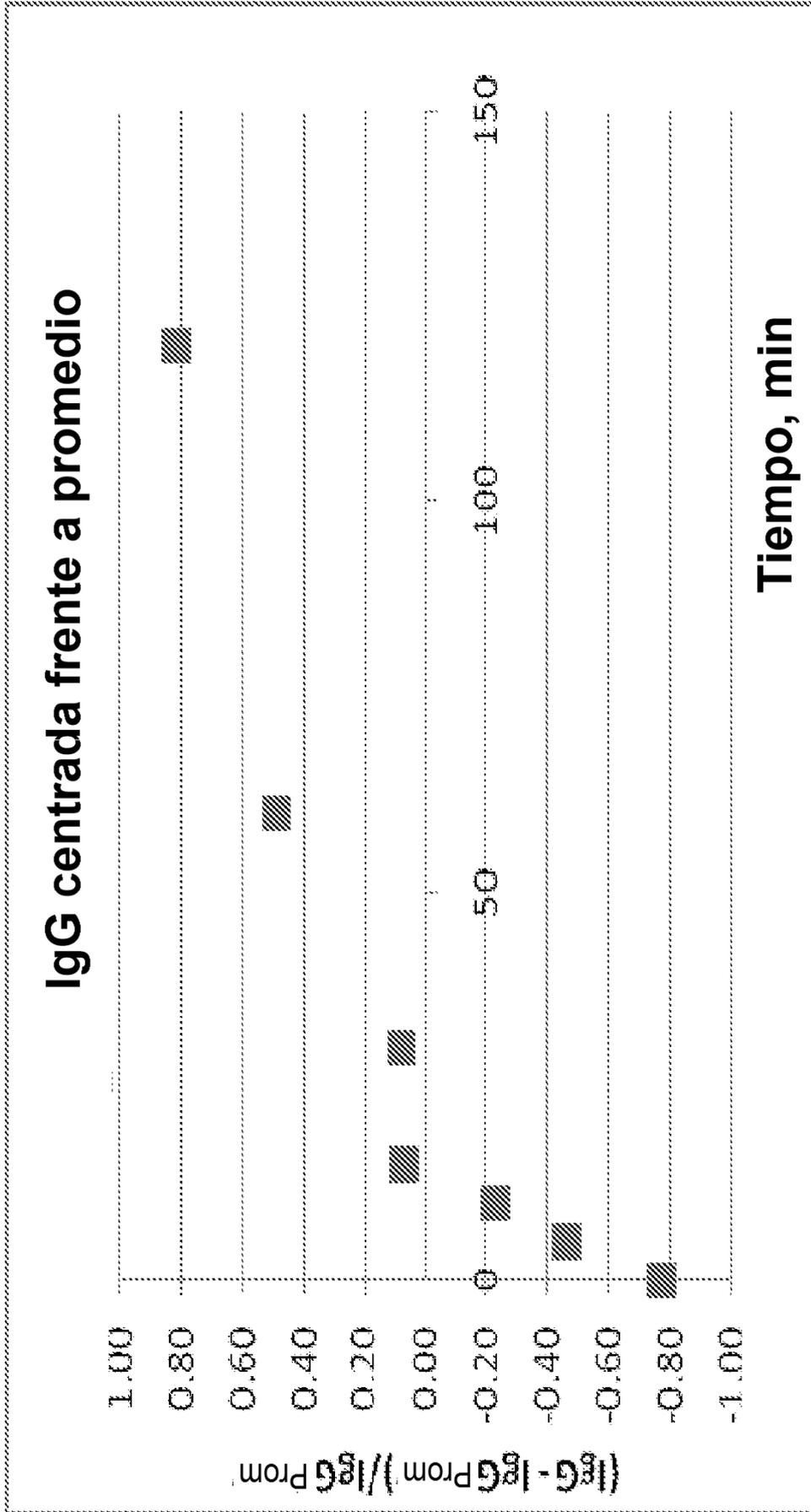
**FIG. 6**



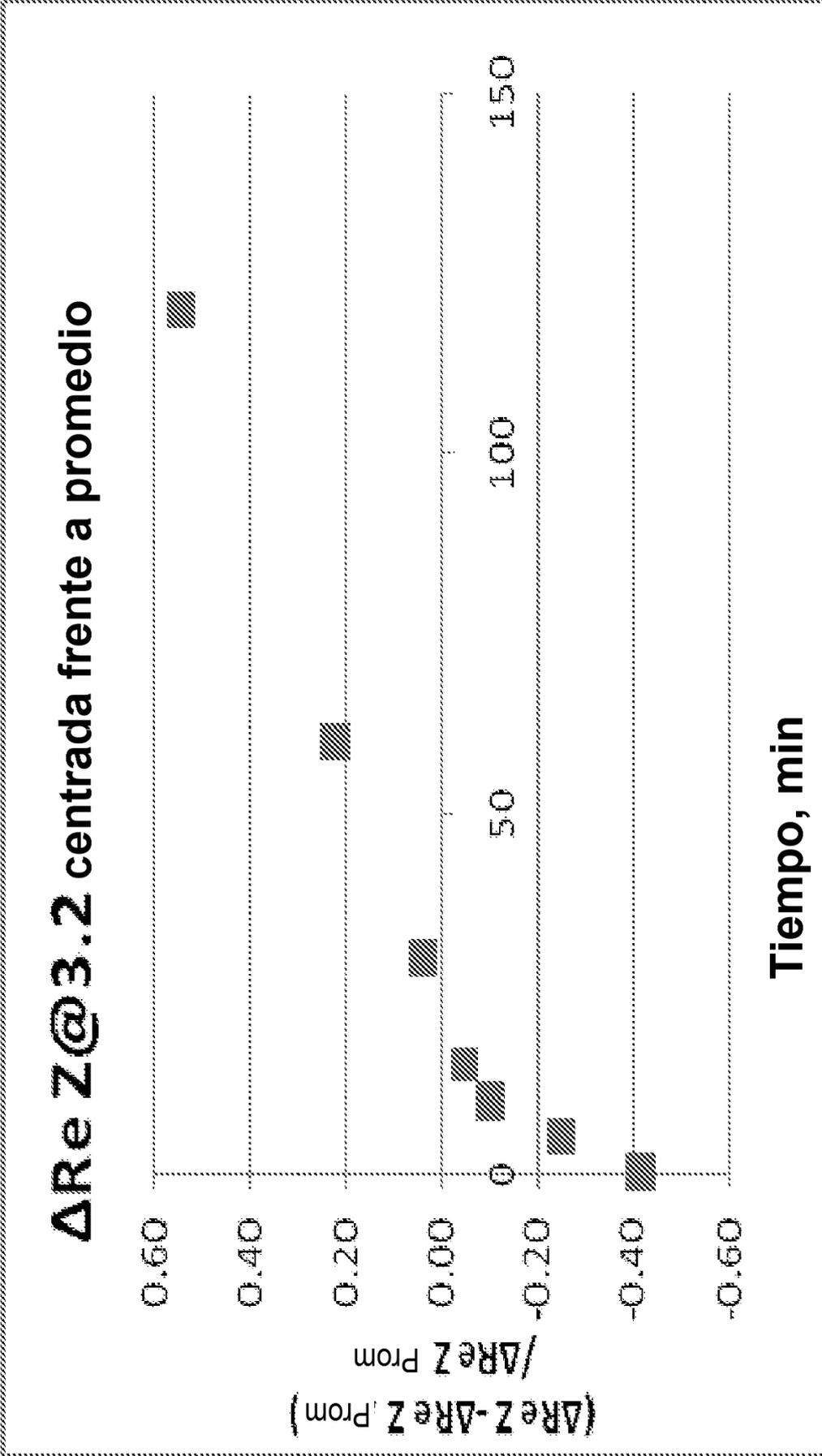
**FIG. 7**



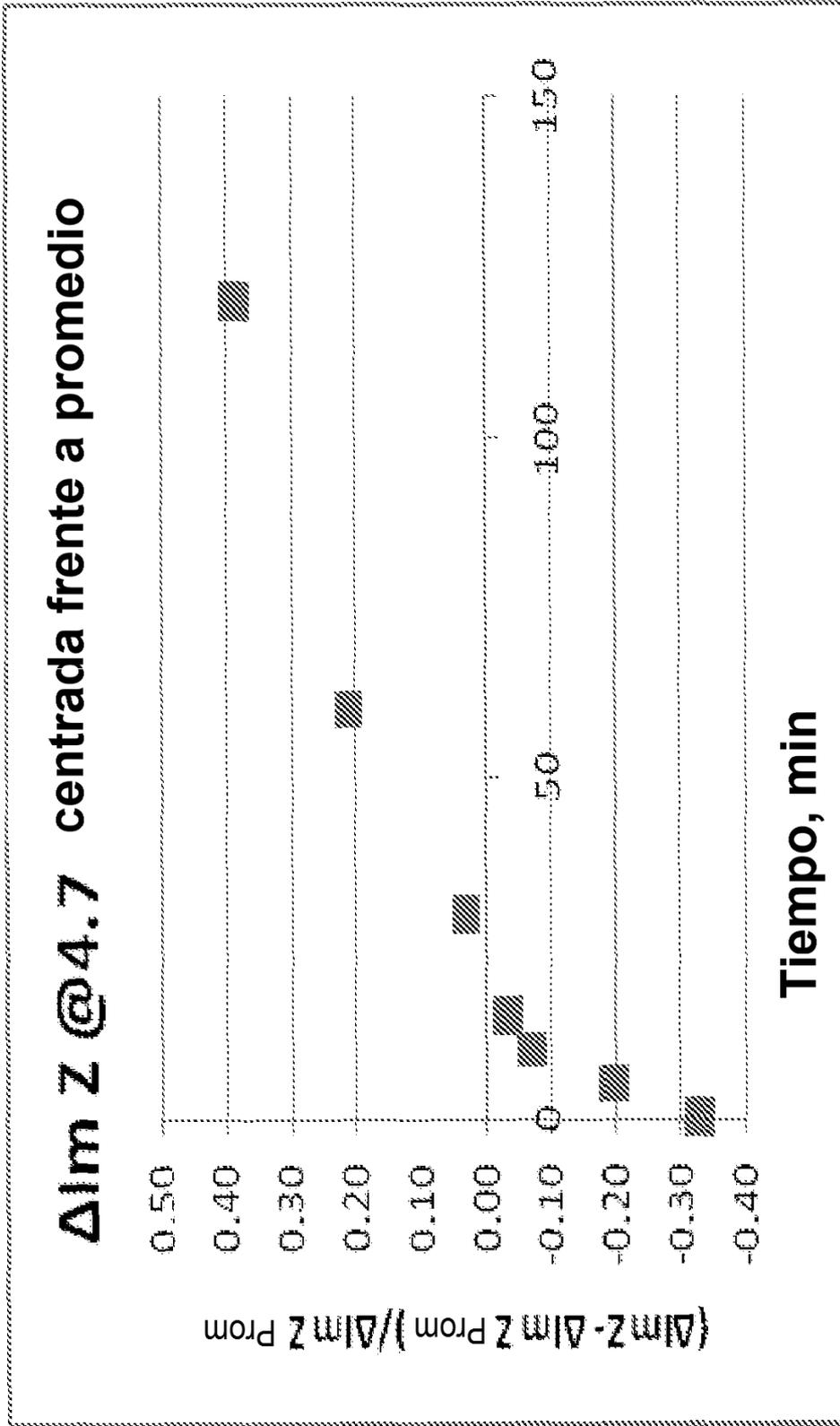
**FIG. 8**



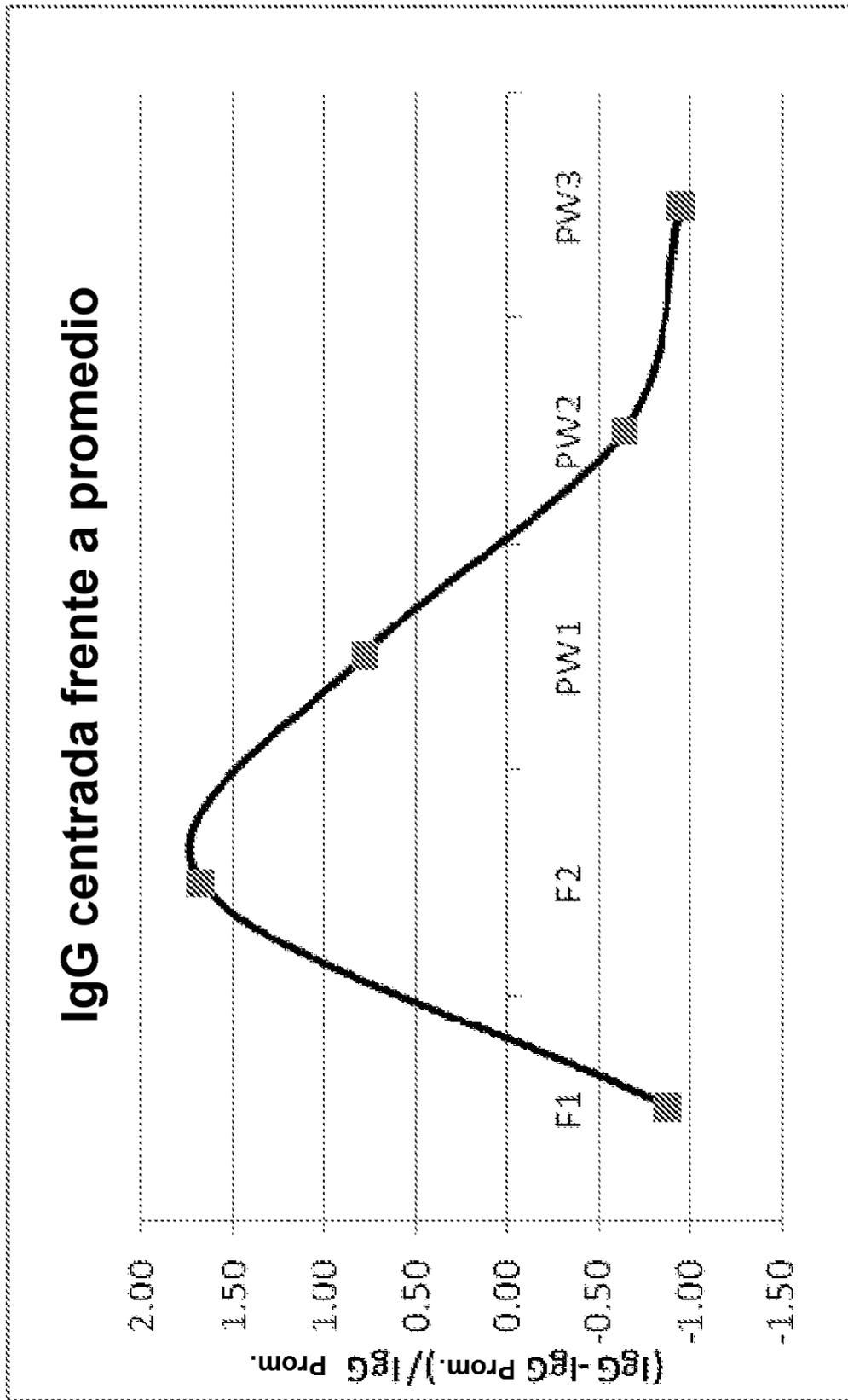
**Fig. 9**



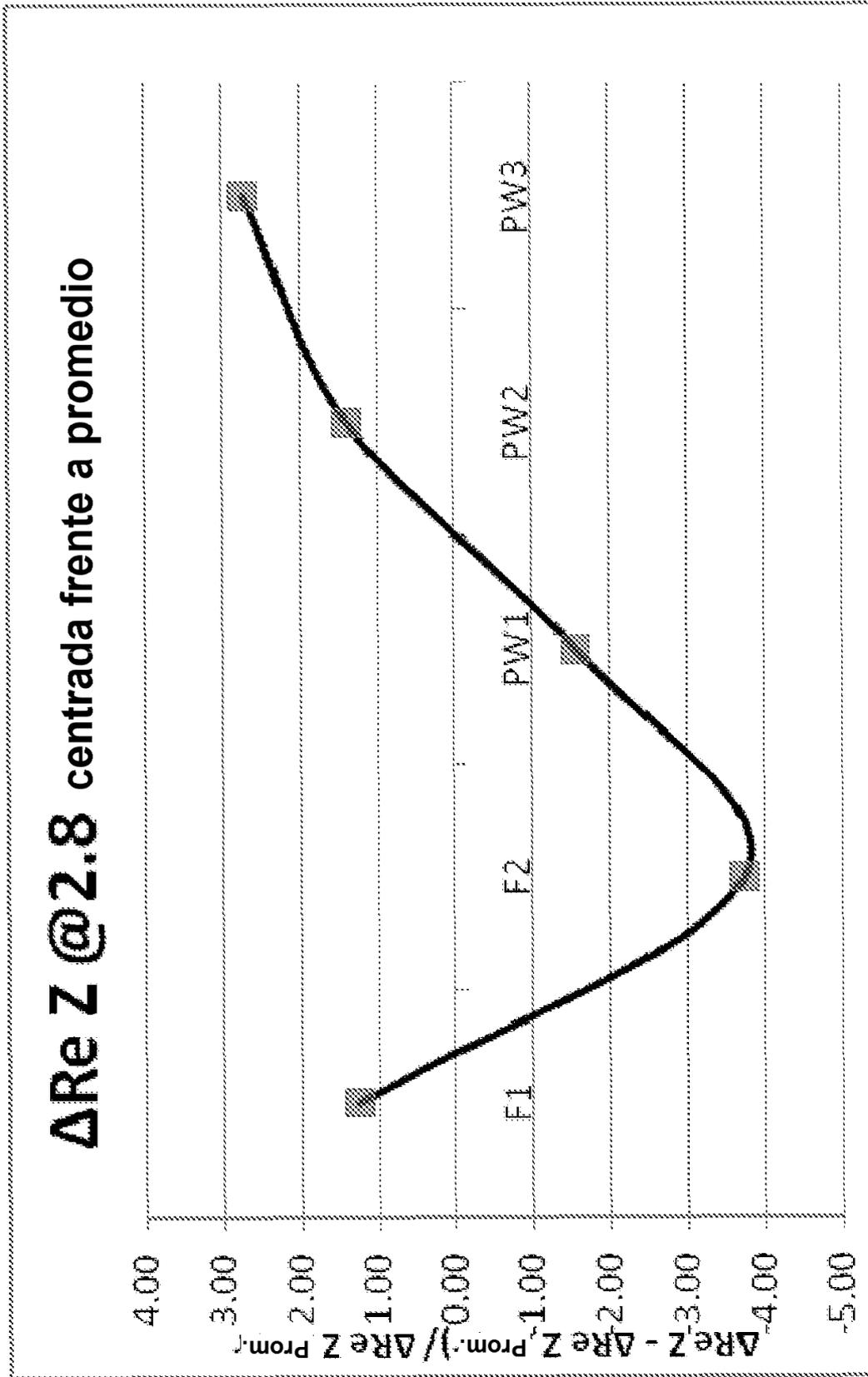
**FIG. 10**



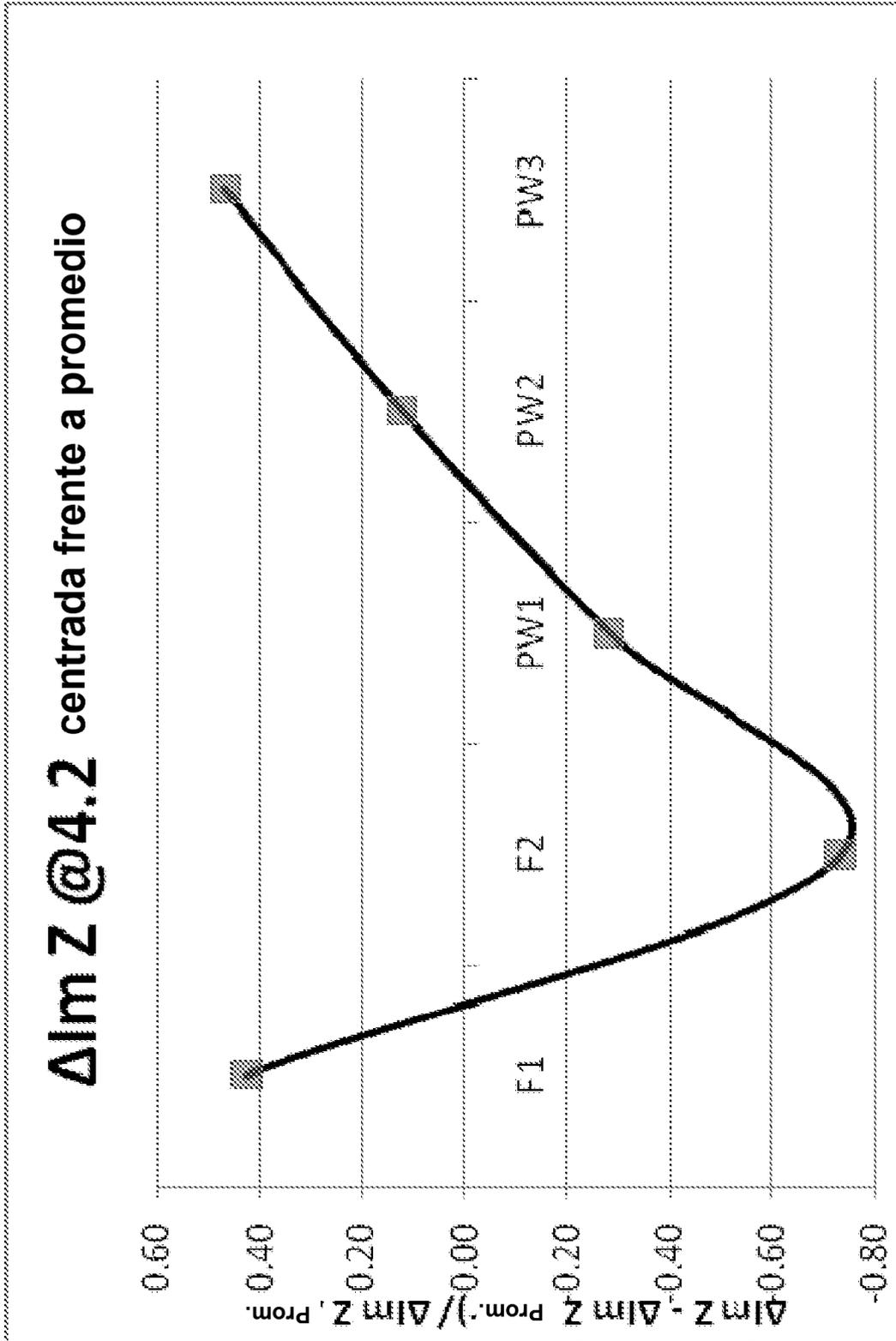
**FIG. 11**



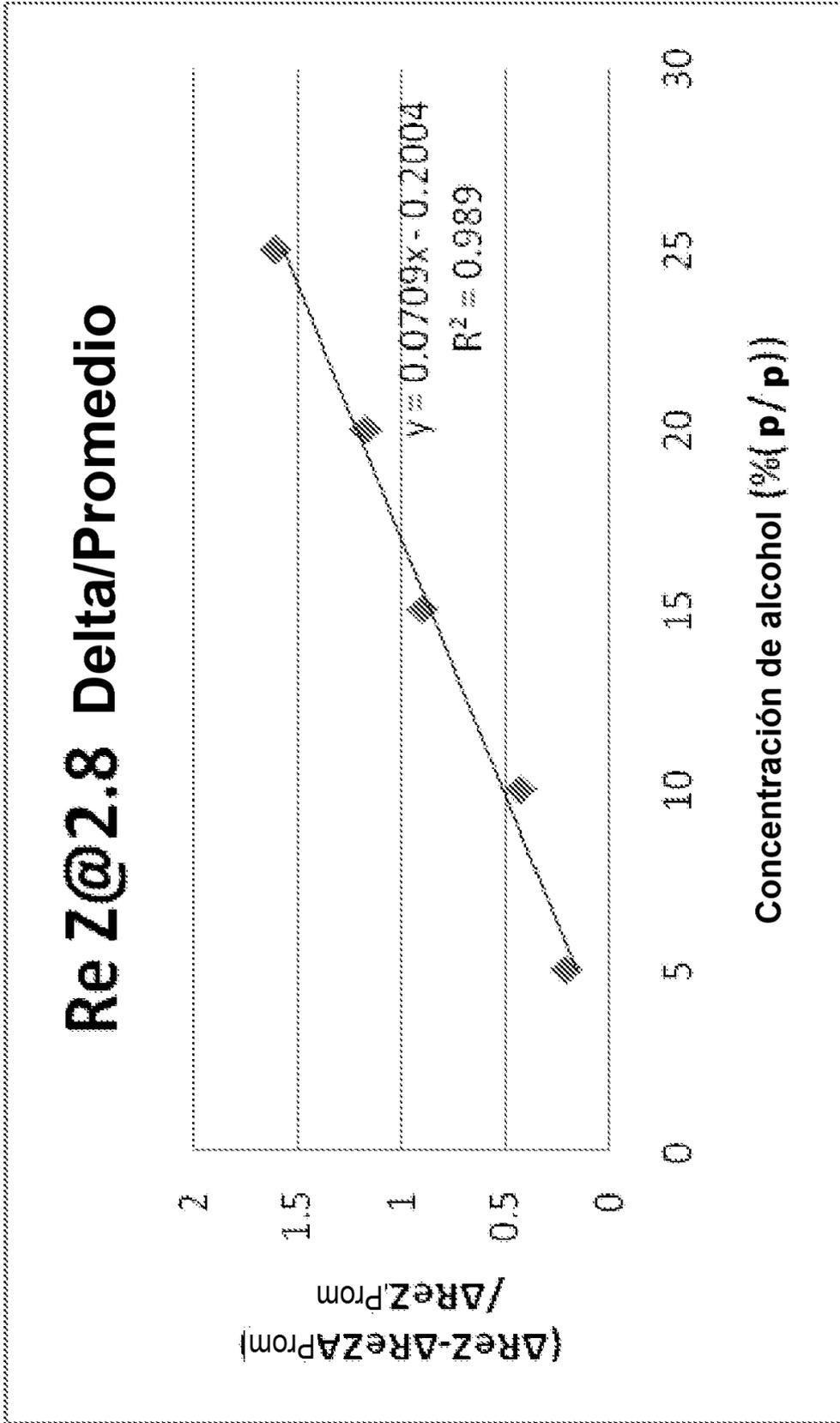
**FIG. 12**



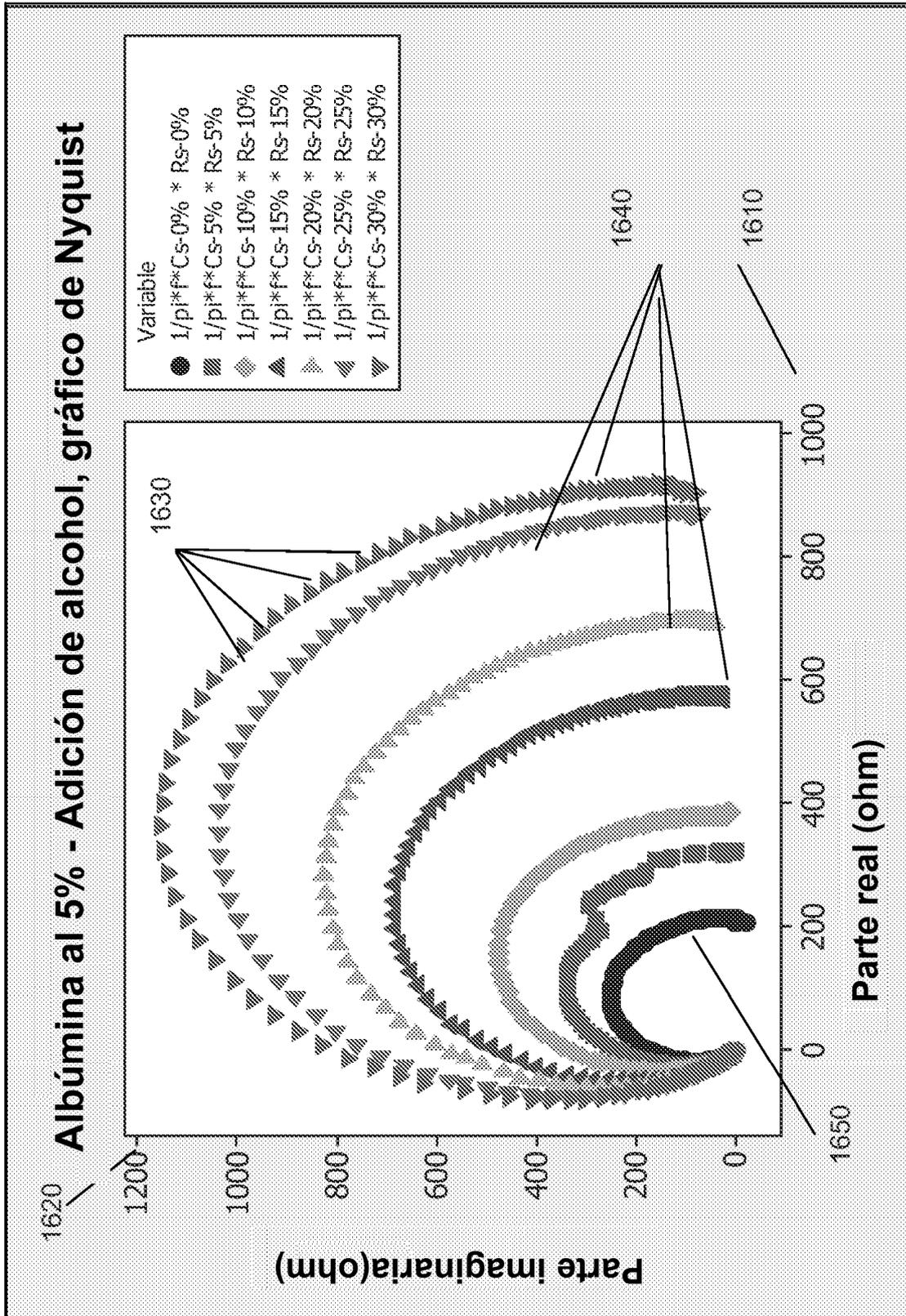
**FIG. 13**



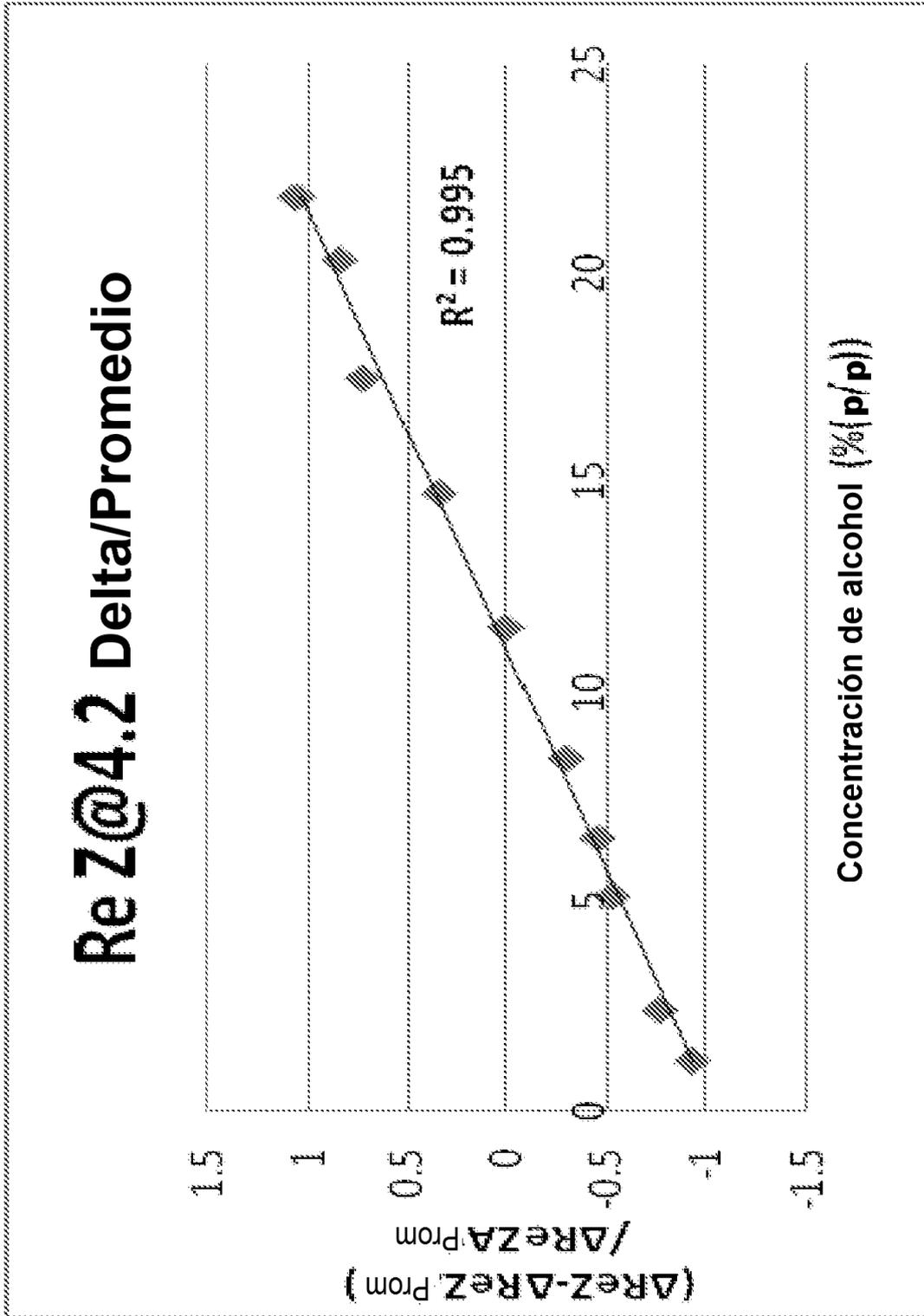
**FIG. 14**



**Fig. 15**



**FIG. 16**



**FIG. 17**