

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 485**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2012 PCT/US2012/052567**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13033042**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2012 E 12768938 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017 EP 2748193**

54 Título: **Método para reducir el potencial tromboembólico de una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma**

30 Prioridad:

26.08.2011 US 201161527974 P

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

14.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TESCHNER, WOLFGANG;
BUTTERWECK, HARALD, ARNO;
KOELBL, BERNHARD;
GNAUER, LUCIA y
SCHWARZ, HANS-PETER**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 624 485 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

Método para reducir el potencial tromboembólico de una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma

5 **Referencia cruzada a solicitud relacionada**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/527.974, presentada el 26 de agosto de 2011.

10 **Antecedentes de la invención**

Los hemoderivados derivados de plasma se usan para tratar no solo una diversidad de trastornos sanguíneos, sino enfermedades de otro origen. Por ejemplo, en 1952 se usaron por primera vez productos de inmunoglobulinas (IgG) procedentes de plasma humano para tratar la inmunodeficiencia. Desde entonces, las preparaciones de IgG han encontrado un uso extendido en al menos tres categorías principales de estados médicos: (1) inmunodeficiencias tales como agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, hipogammaglobulinemia (inmunodeficiencias primarias) y estados de inmunodepresión adquiridos (inmunodeficiencias secundarias), que se caracterizan por bajos niveles de anticuerpos; (2) enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias; y (3) infecciones agudas.

20 Deben tenerse en cuenta diversas precauciones de seguridad cuando se fabrican y formulan terapias biológicas derivadas de plasma. Estas precauciones incluyen métodos para retirar y/o inactivar patógenos de transmisión hemática (por ejemplo, patógenos víricos y bacterianos), actividad anticplemento, y otros contaminantes no deseados que surgen del uso de plasma donado. Los estudios han sugerido que la administración de altos niveles de actividad amidolítica pueden dar como resultado acontecimientos tromboembólicos no deseados (Wolberg AS *et al.*, Coagulation factor XI is a contaminant in intravenous immunoglobulin preparations. *Am J Hematol* 2000; 65:30-34; y Alving BM *et al.*, Contact-activated factors: contaminants of immunoglobulin preparations with coagulant and vasoactive properties. *J Lab Clin Med* 1980; 96:334-346).

30 Esta preocupación se puso de manifiesto con la retirada voluntaria de Octagam® (Octapharma) en EE.UU. y la suspensión de la autorización de comercialización de Octagam® y Octagam 10% por la Comisión Europea tras el aumento de informes de acontecimientos tromboembólicos. Se ha sugerido que el aumento de acontecimientos trombóticos los provocaron altos niveles de actividad amidolítica en los productos biológicos, provocados por serina proteasa e impurezas de zimógeno de serina proteasa, tales como el factor XI, factor XIa, factor XII y factor XIIa (FDA Notice: Voluntary Market Withdrawal – 23 de septiembre de 2010 Octagam [Immune Globulin Intravenous (Human)] 5% Liquid Preparation; Octagam 50 mg/ml, solution pour perfusion- Octapharma France - Mise en quarantaine de tous les lots, publicado en línea el 9 de septiembre de 2010 por la AFSSAPS; y Questions and answers on the suspension of the marketing authorizations for Octagam (human normal immunoglobulin 5% and 10%), publicado en línea el 23 de septiembre 2010 por la Agencia Europea del Medicamento).

40 La EDQM (Dirección Europea para la Calidad del Medicamento y el Cuidado de la Salud) publicó una revisión de la monografía para inmunoglobulina humana normal para administración intravenosa (0918) para una implementación rápida el 1 de enero de 2012 para abordar la actividad procoagulante potencial en productos de inmunoglobulina. La revisión declara que “el método de preparación también incluye una etapa o etapas que han demostrado que retiran agentes que generan trombosis. Se hace énfasis en la identificación de factores de coagulación activados y sus zimógenos y etapas del procedimiento que pueden provocar su activación. También han de tenerse en cuenta otros agentes procoagulantes que podrían introducirse por el procedimiento de fabricación.”

50 El 18 de marzo de 2011, Swissmedic notificó que la FDA había observado acontecimientos adversos tromboembólicos asociados con numerosos lotes del producto Vivaglobin. Vivaglobin (disolución de inmunoglobulina humana normal 160 mg/ml para inyección subcutánea), fabricada por CSL se autorizó como tratamiento sustitutivo para adultos y niños con síndromes de inmunodeficiencia primaria, mieloma o leucemia linfática crónica. No se conocía el riesgo de acontecimientos adversos tromboembólicos hasta ese momento para esta vía de administración. Las investigaciones revelaron actividad procoagulante en al menos algunos lotes. Como consecuencia, Vivaglobin se retiró del mercado y se reemplazó por el nuevo producto Hizenra (disolución de inmunoglobulina humana normal al 20% para inyección subcutánea). Debido a los acontecimientos adversos notificados para Vivaglobin, actualmente es un requisito que los productos de inmunoglobulinas para administración subcutánea tengan bajos niveles de actividad procoagulante, similar a los requisitos para productos de inmunoglobulina por vía intravenosa.

60 Las serina proteasas especializadas, conocidas genéricamente como factores de coagulación, son componentes integrales de tanto las rutas de activación por contacto como del factor tisular de la cascada de coagulación. Tras un estímulo de las rutas de coagulación, los zimógenos de serina proteasa, que son precursores enzimáticos inactivos, se vuelven proteasas activadas que catalizan la activación del siguiente zimógeno de proteasa, dando como resultado una cascada de activación. Esta cascada de coagulación culmina en la activación de trombina (factor IIa) y factor XIIIa, que actúa para convertir el fibrinógeno (factor I) en fibrina (factor Ia) y reticular la fibrina para formar un coágulo de fibrina, respectivamente.

La ruta de activación por contacto, también conocida como ruta de coagulación intrínseca, empieza con la activación de calicreína y factor XIIa (FXIIa) a partir de precalicreína y factor XII, respectivamente. La serina proteasa activada FXIIa escinde el factor XI (FXI), convirtiendo el zimógeno en el factor XIa (FXIa), una serina proteasa activa que participa en la posterior activación del factor Xa (FXa).

Diversos documentos describen métodos para la purificación de IgG que usan cromatografía de intercambio catiónico. La inmunoglobulina se eluye de la columna y se recoge toda la fracción de elución (documentos EP0659767; EP0440483; de Sounca Lucena, Brazilian Journal of pharmaceutical sciences, vol. 46, n.º 4, octubre de 2010, páginas 777-78).

La purificación de gammaglobulina S-sulfonada se describe en una escala industrial usando cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones de elución separadas se someten a prueba para determinar su actividad anticomplementaria (AAC). La reducción de AAC se describe para algunas fracciones después de la purificación (documento GB 2039490).

Se notifica que la purificación a gran escala de anticuerpos monoclonales describe la retirada de impurezas (por ejemplo, agregados de Ig, ADN, HCp y proteína A) usando cromatografía de intercambio catiónico (ZHOU *et al.*, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 1175, n.º 1, 17 de octubre de 2007, páginas 69-80)

Las características de retención de proteínas de prueba (por ejemplo, proteína de unión a heparina; HBP) usando cromatografía de intercambio catiónico se analizan mediante estudios comparativos. Por tanto se determina el efecto de la resina de intercambio catiónico fuerte y débil en el perfil de elución (DE PHILLIPS P *et al.*, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 933, 9 de noviembre de 2001, páginas 57-72).

La purificación de FXI se describe usando un procedimiento de 2 etapas. En primer lugar, se enriquece el contenido en FXI del plasma mediante adsorción inicial usando un filtro. En segundo lugar, se purifica adicionalmente la fracción de FXI usando una etapa cromatografía de intercambio catiónico para la retirada de virus con envolturas lipídicas (BURNOUF-RADOSEVICH M *et al.*, TRANSFUSION, vol. 32, n.º 9, 1 de enero 1992, páginas 861-867).

Se analiza la influencia sobre la unión de FXI a la resina de intercambio catiónico a diferentes valores de pH. Se somete a prueba la fracción no retenida de la columna y los resultados muestran que valores de pH de más de 6 dieron como resultado una retirada de FXIa escasa de la disolución de inmunoglobulina (documento WO201216963).

Debido a las preocupaciones en aumento sobre la presencia de serina proteasa y zimógenos de serina proteasa en composiciones de proteínas derivadas de plasma, sigue habiendo la necesidad en la técnica de métodos para reducir los niveles de estos contaminantes, y en particular de FXI y FXIa, en preparaciones de inmunoglobulina.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona, entre otros aspectos, métodos para reducir el contenido amidolítico (por ejemplo, FXI y/o FXIa) de composiciones de inmunoglobulinas IgG y para composiciones de inmunoglobulinas IgG que tengan niveles menores de actividad amidolítica (por ejemplo, FXI y/o FXIa) que las composiciones comparables disponibles en el mercado.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir el contenido en factor XI (FXI) y/o factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa; (b) poner en contacto la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas IgG y al menos una fracción del FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (c) eluir las inmunoglobulinas IgG de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato que comprende una porción delantera y una porción trasera; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción trasera del eluato contiene una concentración mayor de actividad amidolítica en comparación con la porción delantera del eluato.

En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En otra realización de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En otra realización de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm.

ES 2 624 485 T3

- 5 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende además una etapa de lavado de la resina de intercambio catiónico que tiene las inmunoglobulinas y FXI y/o FXIa unidos a la misma con un tampón de lavado que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de menos de 11 mS/cm antes de eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico en la etapa (c).
- 10 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica de los métodos proporcionados anteriormente, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de intercambio catiónico de carboximetilo.
- 15 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de elución comprende un pH de entre 7,5 y 8,5. En otra realización de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de elución comprende un pH de $8,0 \pm 0,2$.
- 20 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de elución comprende cloruro de sodio entre 200 y 300 mM. En otra realización de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de elución comprende cloruro de sodio entre 240 y 260 mM.
- 25 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de elución comprende glicina entre 100 mM y 300 mM. En otra realización de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de elución comprende glicina entre 175 mM y 225 mM.
- 30 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende recoger un eluato que tiene un pH de no más de 7,0 por separado de un eluato que tiene un pH de más de 7,0.
- 35 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende recoger un eluato que tiene un pH de no más de 6,5 por separado de un eluato que tiene un pH de más de 6,5.
- 40 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende recoger un eluato que tiene un pH de no más de 6,0 por separado de un eluato que tiene un pH de más de 6,0.
- 45 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende recoger un eluato que tiene un pH de no más de 5,5 por separado de un eluato que tiene un pH de más de 5,5.
- 50 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende recoger un eluato que tiene un pH de no más de 5,0 por separado de un eluato que tiene un pH de más de 5,0.
- 55 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende monitorizar el pH del eluato.
- 60 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato comprende las subetapas de: (i) monitorizar la densidad óptica del eluato a 280 nm (DO_{280}); (ii) empezar la recogida cuando la DO_{280} del eluato se eleva por encima de una primera DO_{280} umbral de al menos 50 mUA; y (iii) finalizar la recogida cuando la DO_{280} del eluato desciende por debajo de una segunda DO_{280} umbral de no menos de 1 UA. En otra realización específica, la segunda DO_{280} umbral es de no menos de 2 UA.
- 65 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de lavado comprende un pH de entre 5,0 y 6,0. En otra realización de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de lavado comprende un pH de $5,5 \pm 0,2$.
- En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, menos del 50% del FXI y/o FXIa unido a la resina de intercambio catiónico en la etapa (b) está presente en la porción delantera del eluato recogido en la etapa (d).
- En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, menos del 25% del FXI y/o FXIa unido a la resina de intercambio catiónico en la etapa (b) está presente en la porción delantera del eluato recogido en la etapa (d).
- En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, menos del 10% del FXI y/o FXIa unido a la resina de intercambio catiónico en la etapa (b) está presente en la porción delantera del eluato recogido en la etapa (d).
- En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la cantidad de FXI y/o FXIa se determina realizando un ensayo de la actividad amidolítica usando un sustrato específico para FXIA.

- 5 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma proporcionada en la etapa (a) es un precipitado de la fracción plasmática en suspensión seleccionado del grupo que consiste en un precipitado de la fracción I, un precipitado de la fracción I+II+III, un precipitado de la fracción II+III, la fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann y un precipitado modificado de los mismos.
- 10 En una realización de los métodos proporcionados anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma proporcionada en la etapa (a) es un precipitado de la fracción II en suspensión.
- 15 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para reducir la actividad anticomplemento (AAC) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de AAC; (b) poner en contacto la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas IgG y al menos una fracción de la primera cantidad de AAC a la resina de intercambio catiónico; (c) eluir las inmunoglobulinas IgG de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato que comprende una porción delantera y una porción trasera; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende no más del 80% del eluato.
- 20 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En otra realización de los métodos descritos anteriormente, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En otra realización de los métodos descritos anteriormente, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm.
- 25 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el método comprende además una etapa de lavado de la resina de intercambio catiónico que tiene las inmunoglobulinas y AAC unidas a la misma con un tampón de lavado que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de menos de 11 mS/cm antes de eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico en la etapa (c).
- 30 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica de los métodos descritos anteriormente, la resina de intercambio catiónico débil es resina de intercambio catiónico de carboximetilo.
- 35 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el tampón de elución comprende un pH de entre 7,5 y 8,5. En otra realización de los métodos descritos anteriormente, el tampón de elución comprende un pH de $8,0 \pm 0,2$.
- 40 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el tampón de elución comprende cloruro de sodio entre 200 y 300 mM. En otra realización de los métodos descritos anteriormente, el tampón de elución comprende cloruro de sodio entre 240 y 260 mM.
- 45 En una realización de los métodos descritos anteriormente, el tampón de elución comprende glicina entre 100 mM y 300 mM. En otra realización de los métodos descritos anteriormente, el tampón de elución comprende glicina entre 175 mM y 225 mM.
- 50 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la porción delantera del eluato consiste en no más del 70% del eluato.
- 55 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende recoger un eluato que tiene un pH de no más de 7,0 por separado de un eluato que tiene un pH de más de 7,0.
- 60 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende recoger un eluato que tiene un pH de no más de 6,5 por separado de un eluato que tiene un pH de más de 6,5.
- 65 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende recoger un eluato que tiene un pH de no más de 6,0 por separado de un eluato que tiene un pH de más de 6,0.
- En una realización de los métodos descritos anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende recoger un eluato que tiene un pH de no más de 5,5 por separado de un eluato que tiene un pH de más de 5,5.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende recoger un eluato que tiene un pH de no más de 5,0 por separado de un eluato que tiene un pH de más de 5,0.

- 5 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende monitorizar el pH del eluato.

10 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la etapa de recoger la porción delantera del eluato comprende las subetapas de: (i) monitorizar la densidad óptica del eluato a 280 nm (DO_{280}); (ii) empezar la recogida cuando la DO_{280} del eluato se eleva por encima de una primera DO_{280} umbral de al menos 50 mUA; y (iii) finalizar la recogida cuando la DO_{280} del eluato desciende por debajo de una segunda DO_{280} umbral de no menos de 500 mUA.

15 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la segunda DO_{280} umbral es de no menos de 1 UA. En otra realización de los métodos descritos anteriormente, la segunda DO_{280} umbral es de no menos de 2 UA.

En una realización de los métodos descritos anteriormente, el tampón de lavado comprende un pH de entre 5,0 y 6,0. En otra realización de los métodos descritos anteriormente, el tampón de lavado comprende un pH de $5,5 \pm 0,2$.

20 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción delantera del eluato recogido en la etapa (d) es menor que la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, en la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma proporcionada en la etapa (a).

25 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción delantera del eluato recogido en la etapa (d) es al menos un 25% menor que la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, en la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma proporcionada en la etapa (a).

30 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción delantera del eluato recogido en la etapa (d) es al menos un 50% menor que la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, en la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma proporcionada en la etapa (a).

35 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción delantera del eluato recogido en la etapa (d) es menor que la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, en la porción trasera del eluato recogido en la etapa (d).

40 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción delantera del eluato recogido en la etapa (d) es de menos del 50% de la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, en la porción trasera del eluato recogido en la etapa (d).

45 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción delantera del eluato recogido en la etapa (d) es de menos del 25% de la concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, en la porción trasera del eluato recogido en la etapa (d).

50 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma proporcionada en la etapa (a) es un precipitado de la fracción plasmática en suspensión seleccionado del grupo que consiste en un precipitado de la fracción I, un precipitado de la fracción I+II+III, un precipitado de la fracción II+III, la fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann y un precipitado modificado de los mismos.

55 En una realización de los métodos descritos anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma proporcionada en la etapa (a) es un precipitado de la fracción II en suspensión.

Breve descripción de los dibujos

60 La figura 1 muestra un cromatograma de la etapa de cromatografía de flujo rápido (ff) en CM-Sefarosa descrita en el ejemplo 1. La línea número 1 muestra la absorbancia UV, la línea número 2 muestra el pH y la línea número 3 muestra la conductividad del efluente en la salida de la columna. La densidad óptica a 280 nanómetros indica una separación parcial de dos fracciones durante la elución de la proteína de la columna de ff de CM-Sefarosa. El pH en la salida de la columna empieza a elevarse justo antes del comienzo de la nueva elevación de la absorbancia UV durante la elución. En este punto, las dos fracciones de eluato se separaron tal como se muestra en el cromatograma como F4 y F5 (fracción 4 y fracción 5), denominadas a continuación E1 y E2.

La figura 2 muestra un funcionamiento de cromatógrafo de la serie de ff en CM-Sefarosa descrita en el ejemplo 2. Ilustra el curso de pH y DO 280 durante la elución de la fracción de IgG de ff de CM-Sefarosa (material de partida: ruta II de pasta de fracción II de Cohn; P24701IV; etapas de adsorción: FIX; FVII; AT III).

5 La figura 3 muestra un cromatograma de la etapa de cromatografía de flujo rápido (ff) en CM-Sefarosa descrita en el ejemplo 11. La línea número 1 muestra la absorbancia UV, la línea número 3 muestra el pH y la línea número 2 muestra la conductividad del efluente en la salida de la columna.

10 La figura 4 muestra un cromatograma de la etapa de cromatografía de flujo rápido (ff) en CM-Sefarosa descrita en el ejemplo 12. La línea número 1 muestra la absorbancia UV, la línea número 3 muestra el pH y la línea número 2 muestra la conductividad del efluente en la salida de la columna.

15 La figura 5 muestra un cromatograma de la etapa de cromatografía de flujo rápido (ff) en CM-Sefarosa descrita en el ejemplo 13. La línea número 1 muestra la absorbancia UV, la línea número 3 muestra el pH y la línea número 2 muestra la conductividad del efluente en la salida de la columna.

Descripción detallada de invención

20 I. Introducción

Dado el amplio uso de composiciones de inmunoglobulinas por vía intravenosa derivada de plasma terapéuticas, garantizar la seguridad de estas composiciones es de primordial importancia. Las preocupaciones sobre el contenido amidolítico de composiciones de inmunoglobulinas junto con la aparición de acontecimientos tromboembólicos en
25 pacientes a los que se les administraron inmunoglobulinas derivadas de plasma han puesto de manifiesto la necesidad de métodos para reducir eficazmente serina proteasas (por ejemplo, FXIa y FXIIa) y zimógenos de serina proteasa (por ejemplo, FXI y FXII) durante la fabricación de inmunoglobulinas.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el sorprendente hallazgo de que pueden retirarse cantidades significativas de actividad amidolítica (por ejemplo, FXI y/o FXIa) y/o actividad anticomplemento (AAC) de una
30 composición de inmunoglobulinas recogiendo únicamente la porción delantera de un eluato de intercambio catiónico. De por sí, se proporcionan métodos en el presente documento para reducir la concentración de serina proteasas y zimógenos de serina proteasa durante la fabricación de composiciones de proteínas derivadas de plasma.

En un aspecto, la invención se basa en el descubrimiento de que durante una elución de una sola etapa de una resina de intercambio catiónico, se liberan inmunoglobulinas IgG de la resina antes de la elución de una fracción significativa de actividad amidolítica (por ejemplo, a la que contribuyen al menos FXI y/o FXIa) y/o AAC. Específicamente, se encontró que tras poner en contacto una resina de intercambio catiónico que tiene
35 inmunoglobulinas IgG y proteínas que contribuyen a la actividad amidolítica unidas a la misma con un tampón de elución que tiene un pH de más de al menos 7,0, el eluato inicial recuperado de la columna tiene un pH bajo (por ejemplo, un pH por debajo de 5,0). Tras un periodo de tiempo, el pH del eluato recuperado de la columna cambia a por encima de 7,0. De manera sorprendente, se encontró que el eluato inicial que tiene un pH bajo contiene niveles bajos de actividad amidolítica, contenido en FXI y/o FXIa, y/o contenido en AAC bajos, mientras que el eluato recuperado tras el cambio en el pH contiene un nivel significativamente mayor de actividad amidolítica, contenido en
40 FXI y/o FXIa, y/o contenido en AAC.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se basa en un método para separar una fracción significativa de actividad amidolítica (por ejemplo, factor XI y/o factor XIa) de una composición de inmunoglobulinas IgG uniendo
45 las inmunoglobulinas IgG, la actividad amidolítica y/o AAC a una resina de intercambio catiónico, eluyendo las inmunoglobulinas IgG, la actividad amidolítica y/o AAC en una elución de una sola etapa, y recogiendo la porción delantera del eluato, caracterizada por alto rendimiento de IgG, baja actividad amidolítica, por separado de la porción trasera del eluato, caracterizada por bajo rendimiento de IgG y alta actividad amidolítica.

Entre otras ventajas, los métodos de la invención proporcionan (1) métodos sencillos para retirar actividad amidolítica de composiciones de inmunoglobulinas IgG mediante cromatografía de intercambio catiónico con una
50 elución de una sola etapa; (2) métodos sencillos para identificar rápidamente fracciones de un eluato de intercambio catiónico de inmunoglobulinas IgG que tiene altas actividades amidolíticas (es decir, alto contenido en FXI y/o FXIa), basándose en la monitorización del pH del eluato; (3) métodos para retirar actividad amidolítica de una composición de inmunoglobulinas IgG que no se ven afectados por la concentración de proteína cargada en una resina de intercambio catiónico, que permiten una ampliación a escala sencilla para procedimientos de fabricación a gran
55 escala; (4) métodos que permiten la determinación rápida de qué fracciones de eluato de intercambio catiónico de inmunoglobulinas IgG usar para el procesamiento adicional, basándose en la monitorización del pH; (5) métodos que permiten una reducción significativa en la actividad amidolítica (por ejemplo, contenido en FXI y/o FXIa) con pérdida mínima de rendimiento de inmunoglobulina IgG; (6) métodos para fabricar composiciones de inmunoglobulinas IgG
60 que tienen concentración de agregado de IgG menor, actividad de PKA menor, actividad amidolítica menor tal como se mide con sustratos cromogénicos (incluyendo, pero sin limitarse al sustrato PL-1), una concentración de

monómero de IgG mayor y una distribución de subclases de IgG más deseable; (7) métodos que permiten la determinación rápida de qué fracciones de elución de inmunoglobulinas IgG de intercambio catiónico usar para el procesamiento adicional, basándose en el volumen de elución de la etapa cromatográfica; (8) métodos que permiten la determinación rápida de qué fracciones de elución de intercambio catiónico de inmunoglobulinas IgG usar para el procesamiento adicional, basándose en la absorbancia de proteínas de la fracción particular; (9) la capacidad para utilizar las características ventajosas de la invención en procedimientos de fabricación a gran escala; (10) enriquecimiento de la actividad amidolítica para identificación y cuantificación.

II. Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, el término tratamiento con "IgG por vía intravenosa" o "IG i.v." se refiere generalmente a la administración por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía intramuscular de una composición de inmunoglobulinas IgG a un paciente para su uso en el tratamiento de varios estados tales como inmunodeficiencias, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias. Las inmunoglobulinas IgG se combinan y se preparan normalmente a partir de plasma. Pueden usarse anticuerpos completos o fragmentos. Pueden formularse inmunoglobulinas IgG en concentraciones más altas (por ejemplo, mayores del 10%) para administración subcutánea, o formularse para administración intramuscular. Esto es particularmente común para preparaciones de IgG de especialidad que se preparan con títulos mayores que en promedio para antígenos específicos (por ejemplo, factor ρ D, toxina pertúsica, toxina tetánica, toxina botulínica, rabia, etc.). Para facilitar la descripción, también se incluyen tales composiciones de IgG formuladas por vía subcutánea o por vía intramuscular en el término "IG i.v." en esta solicitud.

Tal como se usa en el presente documento, el término "actividad amidolítica" se refiere a la capacidad de un polipéptido para catalizar la hidrólisis de al menos un enlace peptídico en otro polipéptido. El perfil de actividad amidolítica para una composición de inmunoglobulinas IgG puede determinarse sometiendo a ensayo con diversos sustratos cromogénicos, con diferentes especialidades para proteasas encontradas en plasma humano, incluyendo sin limitación: PL-1 (amplio espectro), S-2288 (amplio espectro), S-2266 (FXIa, calicreínas glandulares), S-2222 (FXa, tripsina), S-2251 (plasmina) y S-2302 (calicreína, FXIa, y FXIIa). Se conocen bien en la técnica métodos para determinar la actividad amidolítica de una composición, por ejemplo, tal como se describe en M. Etscheid *et al.* (Identifications of kallikrein and FXIa as impurities in therapeutic immunoglobulins: implications for the safety and control of intravenous blood products, *Vox Sang* 2011.)

Tal como se usa en el presente documento, los términos "actividad anticomplemento", "actividad anticomplementaria" y "AAC" se usan de manera intercambiable y se refieren a la capacidad de una composición de proteínas, por ejemplo, una composición de inmunoglobulinas IgG, para consumir potencial de complemento en un ensayo de complemento, por ejemplo, un método basado sustancialmente en el método descrito en "Public Health Monograph" n.º 74; Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Microtest, Washington, 1965, y E. A. Kabat y M. Mayer, *Experimental Immunochemistry*; 2ª Ed. Thomas Springfield 1961. La unidad típica de actividad del complemento es la cantidad de complemento que producirá la lisis de $2,5 \times 10^8$, de un total de 5×10^8 glóbulos rojos, óptimamente sensibilizados en una actividad de complemento descrita en el presente documento.

En una realización, la AAC se mide usando una suspensión normalizada de eritrocitos ovinos sensibilizados con anticuerpos, que se incuban con diferentes diluciones de suero de cobaya que actúan como fuente de complemento. El grado de hemólisis se mide de manera espectrofotométrica. Por ejemplo, para determinar la actividad anticomplementaria del producto de inmunoglobulina, se preparan disoluciones de prueba que contienen diversas cantidades del producto de inmunoglobulina y 2 unidades de $C'H_{50}$ de suero de cobaya por ml. En una realización específica, se mide la actividad anticomplementaria incubando una cantidad definida de un material de prueba (por ejemplo, 10 mg de inmunoglobulina IgG) con una cantidad definida de complemento de cobaya (por ejemplo, 20 $C'H_{50}$) y se valora el complemento restante. La actividad anticomplementaria se expresa como el consumo en porcentaje de complemento en relación con el control de complemento, que se considera que es el 100%. En una realización, la AAC se mide según los criterios expuestos en la Farmacopea Europea: Human normal immunoglobulin for intravenous administration. Farmacopea Europea 6.3, monografía 2.6.17, 4166-4168. Consejo de Europa, Estrasburgo Cedex, Francia.

En la bibliografía se describen métodos para disminuir la actividad anticomplementaria de composiciones pretendidas para administración intravenosa (Schultz, H. E. y Schwick, G., *Dtsch. med. Wochenschrift* 87 (1962), 1643; Barandun, S. *et al.*, *Vox Sang.* 28 (1957), 157; Barandun, S. *et al.*, *Vox Sang.* 7 (1962), 187; y Stefen, W., *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 7 (1969), 282.)

Tal como se usa en el presente documento, "plasma pobre en crioprecipitado" se refiere al sobrenadante formado tras la precipitación en frío (crioprecipitación) de plasma o plasma combinado a temperaturas próximas a la congelación, por ejemplo, a temperaturas por debajo de aproximadamente 10°C. En el contexto de la presente invención, plasma puede referirse de manera intercambiable a plasma recuperado (es decir, plasma que se ha separado de sangre completa *ex vivo*) o plasma original (es decir, plasma recogido mediante plasmaféresis). Se realiza crioprecipitación comúnmente, por ejemplo, descongelando el plasma combinado previamente congelado, que ya se ha sometido a ensayo para determinar consideraciones de seguridad y calidad, aunque también puede

usarse plasma nuevo. La descongelación se lleva a cabo normalmente a una temperatura no mayor de 6°C. Tras la descongelación completa del plasma congelado a baja temperatura, se realiza centrifugación en frío (por ejemplo, ≤ 6°C) para separar crioprecipitados sólidos del sobrenadante líquido. Alternativamente, puede realizarse la etapa de separación mediante filtración en vez de centrifugación.

5 Tal como se usa en el presente documento, una “combinación de Cohn” se refiere al material de partida usado para el fraccionamiento de una muestra de plasma o combinación de muestras de plasma. Las combinaciones de Cohn incluyen plasma completo, muestras de plasma pobre en crioprecipitado, y combinaciones de muestras de plasma pobre en crioprecipitado que pueden haberse sometido o no a una etapa de procesamiento previo. En determinadas realizaciones, una combinación de Cohn es una muestra de plasma pobre en crioprecipitado de la que se han retirado uno o más factores sanguíneos en una etapa de procesamiento previo, por ejemplo, adsorción en una fase sólida (por ejemplo, hidróxido de aluminio, dióxido de silicio finamente dividido, etc.), o etapa cromatográfica (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o de afinidad a heparina). Pueden aislarse diversos factores sanguíneos, incluyendo pero sin limitarse a actividad de corrección del inhibidor de factor VIII (FEIBA), complejo de factor IX, concentrado de factor VII o complejo de antitrombina III, de la muestra de plasma pobre en crioprecipitado para formar una combinación de Cohn.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “porción delantera del eluato” se refiere a una primera fracción de una composición de inmunoglobulinas eluida de una resina de intercambio catiónico, caracterizándose la fracción por un alto rendimiento de inmunoglobulina y actividad amidolítica reducida en comparación con la actividad amidolítica total unida a la resina antes de la elución. La porción delantera del eluato es la primera fracción de un eluato liberado de una columna de intercambio catiónico, que se produce antes de la liberación (es decir, elución) de una segunda fracción de una composición de inmunoglobulinas (denominada “porción trasera del eluato”). La porción trasera del eluato contiene únicamente una pequeña cantidad de inmunoglobulinas (normalmente no más del 25%, preferiblemente no más del 10% de la inmunoglobulina unida a la columna) y se caracteriza por una concentración mayor de actividad amidolítica en comparación con la porción delantera del eluato. En diversas realizaciones, las porciones delantera y trasera del eluato pueden definirse por diversas características, incluyendo sin limitación, el pH del eluato, el rendimiento de proteína (por ejemplo, expresado como porcentaje de la proteína unida a la resina), la concentración de proteína (por ejemplo, tal como se determina mediante la densidad óptica) del eluato, el volumen de eluato, y similares.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término “ultrafiltración (UF)” abarca una diversidad de métodos de filtración por membrana en los que la presión hidrostática fuerza un líquido contra una membrana semipermeable. Se retienen sólidos y solutos en suspensión de alto peso molecular, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana. Este procedimiento de separación se usa a menudo para purificar y concentrar disoluciones macromoleculares (10^3 - 10^6 Da), especialmente disoluciones de proteína. Hay disponibles varias membranas de ultrafiltración según el tamaño de las moléculas que retienen. La ultrafiltración se caracteriza normalmente por un tamaño de poro de membrana de entre 1 y 1000 kDa y presiones de funcionamiento de entre 0,01 y 10 bar (1000 pascales a 1.000.000 pascales), y es particularmente útil para separar proteínas de pequeñas moléculas como azúcares y sales.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término “diafiltración” se realiza con las mismas membranas que la ultrafiltración y puede ejecutarse o bien como modo de filtración de extremo cerrado o bien como modo de filtración de flujo tangencial. Durante la diafiltración, se introduce el tampón en el tanque de recirculación mientras que el filtrado se retira de la operación unitaria. En procedimientos en los que el producto está en el material retenido (por ejemplo, inmunoglobulinas IgG), la diafiltración retira mediante lavado los componentes de la combinación de producto en el filtrado, intercambiando así tampones y reduciendo la concentración de especies no deseables.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “detergente” se usa en esta solicitud de manera intercambiable con el término “tensoactivo” o “agente de acción superficial.” Los tensoactivos son normalmente compuestos orgánicos que son anfifílicos, es decir, que contienen tanto grupos hidrófobos (“colas”) como grupos hidrófilos (“cabezas”), que hacen que los tensoactivos sean solubles tanto en disolventes orgánicos como en agua. Un tensoactivo puede clasificarse por la presencia de grupos formalmente cargados en su cabeza. Un tensoactivo no iónico no tiene grupos cargados en su cabeza, mientras que un tensoactivo iónico porta una carga neta en su cabeza. Un tensoactivo zwitteriónico contiene una cabeza con dos grupos cargados de manera opuesta. Algunos ejemplos de tensoactivos comunes incluyen: aniónicos (basados en aniones sulfato, sulfonato o carboxilato): perfluorooctanoato (PFOA o PFO), perfluorooctanosulfonato (PFOS), dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de amonio, y otras sales de sulfato de alquilo, lauril éter sulfato de sodio (también conocido como SLES), sulfonato de alquilbenceno; catiónicos (basados en cationes de amonio cuaternario): bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), también conocido como bromuro de hexadeciltrimetilamonio, y otras sales de alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio (CPC), amina de sebo polietoxilado (POEA), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de bencetonio (BZT); ácidos grasos de cadena larga y sus sales: incluyendo caprilato, ácido caprílico, heptanoato, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido nanoico, ácido decanoico, y similares; zwitteriónicos (anfóteros): dodecilbetaína; cocamidopropilbetaína; cocoanfoglucinato; no iónicos: poli(óxido de etileno) de alquilo, poli(óxido de etileno) de alquilfenol, copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de polipropileno) (comercialmente conocidos como poloxámeros o poloxaminas), alquilpoliglucósidos, incluyendo octilglucósido, decilmaltósido, alcoholes grasos (por

ejemplo, alcohol cetílico y alcohol oleílico), cocamida MEA, cocamida DEA, polisorbatos (Tween 20, Tween 80, etc.), detergentes Triton y óxido de dodecildimetilamina.

Tal como se usa en esta solicitud, el término “pulverización” se refiere a un medio de suministrar una sustancia líquida en un sistema, por ejemplo, durante una etapa de precipitación con alcohol, tal como una etapa de precipitación de fraccionamiento I o II+III de Cohn modificada, en forma de gotitas finas o niebla de la sustancia líquida. La pulverización puede lograrse mediante cualquier dispositivo presurizado, tal como un recipiente (por ejemplo, una botella de pulverizador), que tiene una cabeza o una boquilla de pulverizador y que se hace funcionar de manera manual o automática para generar una niebla fina a partir de un líquido. Normalmente, se realiza pulverización mientras el sistema que recibe la sustancia líquida se agita continuamente o se mezcla de otro modo para garantizar una distribución rápida y equitativa del líquido dentro del sistema.

Con “cantidad o dosis terapéuticamente eficaz” o “cantidad o dosis suficiente/eficaz,” quiere decirse una dosis que produce los efectos por los cuales se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y se podrá determinar por un experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vol. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

II. Reducción de la actividad amidolítica

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos cromatográficos para reducir la actividad amidolítica (por ejemplo, reduciendo el contenido de FXI/FXIIa y/o FXII/FXIIa) de una composición de inmunoglobulinas IgG derivada de plasma. Asimismo, la divulgación también proporciona composiciones de inmunoglobulinas IgG derivadas de plasma que contienen bajos niveles de actividad amidolítica (por ejemplo, bajos niveles de FXI/FXIIa y/o FXII/FXIIa) preparadas según los métodos proporcionados en el presente documento. Ventajosamente, los métodos descritos en el presente documento proporcionan composiciones de inmunoglobulinas IgG derivadas de plasma con perfiles de seguridad mejorados. Específicamente, las composiciones proporcionadas por estos métodos tienen potencial reducido para provocar acontecimientos tromboembólicos no deseados, en comparación con composiciones de inmunoglobulinas IgG fabricadas actualmente.

A. Métodos de fraccionamiento

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que una mayor parte de la actividad amidolítica presente en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma eluye de una resina de intercambio catiónico en la porción trasera de un eluato creado mediante una elución en etapas, mientras que una mayor parte del contenido en inmunoglobulinas de la fracción eluye en la porción delantera de dicho eluato. Por consiguiente, al recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, la actividad amidolítica de la preparación de inmunoglobulinas resultante se reduce significativamente. Específicamente, se muestra en el presente documento que el contenido en factor XIa y, por tanto, la actividad amidolítica asociada con el contenido en factor XIa, se reduce significativamente en composiciones de inmunoglobulinas preparadas según los métodos proporcionados en el presente documento.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica (es decir, contaminantes proteicos que tienen actividad amidolítica) en una resina de intercambio catiónico; (b) lavar opcionalmente la resina de intercambio catiónico que tiene proteínas unidas a la misma con un tampón de lavado para retirar contaminantes ligeramente asociados; (c) realizar una elución de una sola etapa de las inmunoglobulinas IgG y la actividad amidolítica; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción trasera del eluato contiene una alta concentración de actividad amidolítica. En una realización específica, la actividad amidolítica es la actividad del factor XIa presente en la composición. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, la invención proporciona un método para reducir la cantidad de factor XI (FXI) y/o factor XIa (FXIIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIIa con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción del FXI y/o FXIIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por

separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción trasera del eluato contiene una alta concentración de actividad amidolítica. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, el método comprende las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de entre 4,8 y 5,6 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción del FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción trasera del eluato contiene una alta concentración de actividad amidolítica. En una realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,1$. En aún otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es 5,2. En aún otras realizaciones, el pH de la primera condición de disolución es 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, el método comprende las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción del FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) lavar la resina con las inmunoglobulinas y FXI y/o FXIa unidos a la misma con un tampón que tiene una conductividad lo suficientemente baja de manera que las inmunoglobulinas no se eluyen de la resina y un pH de entre 5,1 y 5,9; (c) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción trasera del eluato contiene una alta concentración de actividad amidolítica. En una realización específica, el pH del tampón de lavado es $5,5 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH del tampón de lavado es $5,5 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH del tampón de lavado es 5,5. En aún otras realizaciones, el pH del tampón de lavado es 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, el método comprende las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción del FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de $7,8 \pm 0,4$ y una conductividad de al menos 20 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción trasera del eluato contiene una alta concentración de actividad amidolítica. En una realización específica, el pH del tampón de elución es $7,8 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH del tampón de elución es $7,8 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH del tampón de elución es $7,8 \pm 0,1$. En otra realización específica, el pH del tampón de elución es 7,8. En aún otras realizaciones, el pH del

tampón de elución es 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4 u 8,5. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

Generalmente, el material de partida usado para los métodos proporcionados en el presente documento incluye cualquier fracción de plasma o composición que comprende inmunoglobulina IgG y actividad amidolítica. Como tal, en una realización, se fracciona parcial o completamente plasma según uno cualquiera de los esquemas de purificación conocidos en la técnica. En una realización específica, se fracciona el plasma para producir un precipitado de la fracción I, un precipitado de la fracción II, un precipitado de la fracción I+II+III, un precipitado de la fracción II+III, la fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann, o un precipitado modificado de los mismos, que puede usarse como material de partida para los métodos proporcionados en el presente documento.

En una realización preferida, se fracciona el plasma mediante una o más etapas de precipitación con etanol. Pueden emplearse etapas de precipitación con etanol para o bien precipitar las inmunoglobulinas deseadas de la disolución, mientras se retiene al menos una proteína distinta de inmunoglobulina en el sobrenadante, o bien precipitar al menos una proteína distinta de inmunoglobulina de la disolución, mientras se retiene la inmunoglobulina deseada en el sobrenadante. Los métodos para el fraccionamiento de inmunoglobulinas de esta manera se conocen bien en la técnica. Los precipitados con etanol a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, un precipitado de la fracción I, un precipitado de la fracción I+II+III, un precipitado de la fracción II+III, la fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann, y precipitados modificados de los mismos. En una realización particularmente preferida, las inmunoglobulinas presentes en el plasma pobre en crioprecipitado se enriquecen mediante un procedimiento con etanol de cuatro etapas, que comprende una etapa de precipitación de la fracción I+II+III, una etapa de precipitación de A, una etapa de precipitación de B y una etapa de precipitación de la fracción II.

En una realización, el material de partida para los métodos para reducir la actividad amidolítica proporcionados en el presente documento se prepara mediante fraccionamiento con etanol de plasma humano combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). En una realización específica, el fraccionamiento con etanol incluye la precipitación de la fracción I+II+III de plasma pobre en crioprecipitado, precipitación de la fracción A de un precipitado de la fracción I+II+III en suspensión, precipitación de la fracción B de un precipitado de la fracción A en suspensión y precipitación de la fracción II de un sobrenadante de la fracción A, tal como se describe a continuación. En otra realización específica, el fraccionamiento con etanol incluye precipitación de la fracción I de plasma pobre en crioprecipitado, precipitación de la fracción II+III de un sobrenadante de la fracción I y precipitación de la fracción II de un precipitado de la fracción II+III en suspensión.

Tal como se demuestra en el presente documento, las características ventajosas de los métodos proporcionados en el presente documento se mantienen cuando se aplican a procedimientos de fabricación a gran escala. Con respecto a la preparación de composiciones de inmunoglobulinas IgG, la fabricación a gran escala se refiere a procedimientos que enriquecen inmunoglobulinas a partir de al menos 100 l de material de partida de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). Generalmente, los procedimientos de fabricación de inmunoglobulinas a gran escala fraccionarán entre 100 l y 20.000 l de plasma combinado por lote. En determinadas realizaciones, un procedimiento de fabricación de inmunoglobulina IgG a gran escala se refiere al fraccionamiento de al menos 100 l de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). En otra realización, un procedimiento de fabricación de inmunoglobulinas IgG a gran escala se refiere al fraccionamiento de al menos 500 l de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). En otra realización, un procedimiento de fabricación de inmunoglobulina IgG a gran escala se refiere al fraccionamiento de al menos 1.000 l de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). En otra realización, un procedimiento de fabricación de inmunoglobulina IgG a gran escala se refiere al fraccionamiento de al menos 5000 l de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). En aún otra realización, un procedimiento de fabricación de inmunoglobulina IgG a gran escala se refiere al fraccionamiento de al menos 10.000 l de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado).

Generalmente, se contemplan métodos que contienen todas las combinaciones de las condiciones de carga, condiciones de lavado y condiciones de elución descritas anteriormente. Además, se contemplan métodos que contienen todas las combinaciones de las condiciones cromatográficas específicas con todos los posibles esquemas para definir y recoger la porción delantera del eluato, tal como se describe a continuación.

1. Porciones delantera y trasera del eluato de intercambio catiónico

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para reducir la actividad amidolítica, y específicamente la actividad amidolítica aportada por impurezas del FXIa, presente en preparaciones de inmunoglobulina recogiendo la porción delantera de un eluato de intercambio catiónico. Ventajosamente, se muestra en el presente documento que la porción delantera de un eluato formado por elución de una sola etapa de una etapa cromatográfica de intercambio

catiónico contiene la mayor parte del contenido en inmunoglobulina deseado, mientras que la porción trasera del eluato contiene la mayor parte de la actividad amidolítica no deseada. Debido a que la elución de las inmunoglobulinas y la actividad amidolítica no pueden separarse completamente, debe determinarse una división entre las porciones delantera y trasera del eluato. Deben tenerse en cuenta dos consideraciones principales cuando se realiza esta determinación, concretamente: (i) que según cómo se definan las porciones delantera y trasera del eluato, se recuperará más o menos actividad amidolítica en la porción delantera -es decir, puede separarse una porción de actividad amidolítica mayor del contenido en inmunoglobulinas cuando se define la porción delantera del eluato como una porción más pequeña del eluato total, y viceversa; y (ii) que según cómo se definan las porciones delantera y trasera del eluato, estarán presentes rendimientos de recuperación de inmunoglobulinas mayores o menores en la porción delantera -es decir, se logrará un rendimiento de inmunoglobulina más bajo cuando se define la porción delantera del eluato como una porción más pequeña del eluato total, y viceversa.

Por consiguiente, el experto en la técnica decidirá dónde trazar el límite entre las porciones delantera y trasera del eluato de intercambio catiónico basándose en sus necesidades individuales. Por ejemplo, cuando se prepara una purificación a pequeña escala para investigación o un propósito terapéutico especializado, el experto en la técnica podría maximizar la potencia de separación del método recogiendo una porción delantera del eluato más pequeña, mientras que se sacrifica el rendimiento de inmunoglobulina final. En cambio, cuando se realiza fabricación a gran escala (por ejemplo, procesamiento de más de 500 l de plasma pobre en crioprecipitado), el coste de oportunidad puede dictar que se recoja una porción delantera del eluato más grande para aumentar el rendimiento de recuperación de inmunoglobulina a expensas de una reducción más moderada en la actividad amidolítica de la composición.

En diversas realizaciones, las porciones delantera y trasera del eluato pueden definirse por diversas características incluyendo, sin limitación, el pH del eluato, el rendimiento de proteína (por ejemplo, expresado como porcentaje de la proteína unida a la resina), la concentración de proteína (por ejemplo, tal como se determina mediante la densidad óptica) del eluato, el volumen de eluato, y similares.

a. pH del eluato

Tal como se demuestra en los ejemplos proporcionados en el presente documento, el comienzo de la etapa de elución de intercambio catiónico está marcado por una caída en el pH de la disolución que sale de la columna, hasta un pH por debajo de 5,0, a pesar de que el tampón de elución tiene un pH mayor (generalmente > 7,5) que el de la carga de la columna y las etapas de lavado (generalmente 5,0-6,0). Esta caída en el pH se corresponde con la elución de una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene actividad amidolítica y contenido en factor XIa bajos (por ejemplo, véanse la tabla 4 y la tabla 11, respectivamente). En un momento posterior en la elución, el pH de la disolución que sale de la columna se eleva considerablemente, hasta más de 6,0-8,0. Este cambio en el pH es concomitante con un aumento significativo en la actividad amidolítica y el contenido en factor XIa del eluato (por ejemplo, véanse la tabla 4 y la tabla 11, respectivamente). Por tanto, aunque se realiza una elución en etapas mediante la aplicación de un solo tampón de elución de pH alto (mayor de 7,5), el perfil de elución se parece a una elución en dos etapas en la que las inmunoglobulinas IgG se eluyen en primer lugar de la columna, seguido por la actividad amidolítica acompañante (por ejemplo, factor XI y/o factor XIa). Por tanto, en determinadas realizaciones, las porciones delantera y trasera del eluato se definen basándose en el pH del eluato en la salida de la columna.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica (es decir, contaminantes proteicos que tienen actividad amidolítica) en una resina de intercambio catiónico; (b) lavar opcionalmente la resina de intercambio catiónico que tiene proteínas unidas a la misma con un tampón de lavado para retirar contaminantes ligeramente asociados; (c) realizar una elución de una sola etapa de las inmunoglobulinas IgG y la actividad amidolítica; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 7,0. En una realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 6,5. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 6,0. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 5,5. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 5,0. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, o menos. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, la invención proporciona un método para reducir la cantidad de factor XI (FXI) y/o factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción del FXI y/o FXIa a la resina de

intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 7,0. En una realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 6,5. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 6,0. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 5,5. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 5,0. En aún otras realizaciones, en otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, o menos. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

b. Absorbancia del eluato

En aún otra realización particularmente adecuada para la fabricación a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones delantera y trasera del eluato se definen por la concentración de inmunoglobulina que eluye de la columna de intercambio catiónico. Por ejemplo, durante la fabricación a gran escala, la composición de inmunoglobulinas puede cargarse en la resina de intercambio catiónico a cargas de proteína lo suficientemente altas (por ejemplo, > 80 mg de proteína por ml de resina) de manera que el eluato pico esté altamente concentrado. En estos casos, la porción delantera del eluato puede definirse como la fracción del eluato que eluye antes del punto en el que la DO_{280} cae por debajo de un valor umbral. De esta manera, puede recuperarse de manera reproducible aproximadamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a la siguiente, independientemente de pequeñas variaciones entre las series de fabricación. Tal como se demuestran en el ejemplo 9, la aplicación de este esquema de recogida para un procedimiento de fabricación a gran escala da como resultado una recuperación de alto rendimiento de una composición de inmunoglobulinas IgG con un contenido en actividad amidolítica y TGA significativamente reducido.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica (es decir, contaminantes proteicos que tienen actividad amidolítica) en una resina de intercambio catiónico; (b) lavar opcionalmente la resina de intercambio catiónico que tiene proteínas unidas a la misma con un tampón de lavado para retirar contaminantes ligeramente asociados; (c) realizar una elución de una sola etapa de las inmunoglobulinas IgG y la actividad amidolítica; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 1,0 UA. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 1,5 UA. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 2,0 UA. En aún otras realizaciones específicas, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 1,0 UA, 1,1 UA, 1,2 UA, 1,3 UA, 1,4 UA, 1,5 UA, 1,6 UA, 1,7 UA, 1,8 UA, 1,9 UA, 2,0 UA, o más. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, la invención proporciona un método para reducir la cantidad de factor XI (FXI) y/o factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción del FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 2,0 UA. En una realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 1,5 UA. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 1,0 UA. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 1,0 UA. En aún otras realizaciones específicas, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 1,0 UA, 1,1 UA, 1,2 UA, 1,3 UA, 1,4 UA, 1,5 UA, 1,6 UA, 1,7 UA, 1,8 UA, 1,9 UA, 2,0 UA, o más. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra

realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

5 c. Porcentaje del eluato total

En aún otra realización particularmente adecuada para la fabricación a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones delantera y trasera del eluato se definen como un porcentaje del contenido en proteína total del eluato (por ejemplo, en volumen o proteína total). Al predeterminar el porcentaje del eluato que va a recogerse en la porción delantera, el rendimiento de recuperación de inmunoglobulina puede controlarse estrechamente. Este método para definir las porciones delantera y trasera del eluato es particularmente útil para procedimientos de fabricación que requieren un rendimiento de etapas mínimo y para procedimientos en los que se toma una decisión basándose en sopesar el coste de rendimientos de inmunoglobulina reducidos con el beneficio de producir una composición que tiene un contenido amidolítico y en factor XI y/o factor XIa reducido. De esta manera, puede recuperarse de manera reproducible aproximadamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a la siguiente, independientemente de pequeñas variaciones entre las series de fabricación. Tal como se demuestra en el ejemplo 8, la aplicación de este esquema de recogida puede dar como resultado una recuperación de alto rendimiento de una composición de inmunoglobulinas IgG con un contenido en actividad amidolítica y TGA significativamente reducido.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica (es decir, contaminantes proteicos que tienen actividad amidolítica) en una resina de intercambio catiónico; (b) lavar opcionalmente la resina de intercambio catiónico que tiene proteínas unidas a la misma con un tampón de lavado para retirar contaminantes ligeramente asociados; (c) realizar una elución de una sola etapa de las inmunoglobulinas IgG y la actividad amidolítica; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en no más del 80% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 70% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 70% y el 75% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 75% y el 80% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79% o el 80% del eluato total. En otra realización, la porción delantera (es decir, la fracción recogida o combinada de interés) del eluato es de no más del 70% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y el 70% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 70% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y 65% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 65% y el 70% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69% o el 70% del eluato total. En otra realización, la porción delantera (es decir, la fracción recogida o combinada de interés) del eluato es de no más del 60% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 60% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 55% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 55% y el 60% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 50%, el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59% o el 60% del eluato total. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, la divulgación proporciona un método para reducir la cantidad de factor XI (FXI) y/o factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción del FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en no más del 80% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 70% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 70% y el 75% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 75% y el 80% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79% o el 80% del eluato total. En otra realización, la porción delantera (es decir, la fracción recogida o

combinada de interés) del eluato es de no más del 70% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y el 70% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 70% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y 65% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 65% y el 70% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69% o el 70% del eluato total. En otra realización, la porción delantera (es decir, la fracción recogida o combinada de interés) del eluato es de no más del 60% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 60% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 55% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 55% y el 60% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 50%, el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59% o el 60% del eluato total. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

d. Volumen del eluato total

En otra realización particularmente adecuada para la fabricación a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones delantera y trasera del eluato se definen como volúmenes del pico del eluato en relación con el tamaño de la columna de intercambio catiónico (por ejemplo, mediante un número establecido de volúmenes de columna). Al predeterminar un volumen de eluato que va a recogerse en la porción delantera, el rendimiento de recuperación de inmunoglobulinas puede controlarse estrechamente y reproducirse. Este método para definir las porciones delantera y trasera del eluato es particularmente útil para procedimientos de fabricación que requieren un rendimiento de etapas mínimo y para procedimientos en los que se toma una decisión basándose en sopesar el coste de rendimientos de inmunoglobulinas reducidos con el beneficio de producir una composición que tiene un contenido amidolítico y en factor XI y/o factor XIa reducido. De esta manera, puede recuperarse de manera reproducible aproximadamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a la siguiente, independientemente de pequeñas variaciones entre las series de fabricación. Tal como se demuestra en los ejemplos 11 a 13, la aplicación de este esquema de recogida puede dar como resultado una recuperación de alto rendimiento de una composición de inmunoglobulinas IgG con un contenido en actividad amidolítica y TGA significativamente reducido.

En una realización, el comienzo de la porción delantera está definido por una absorbancia de referencia. En algunas realizaciones, la recogida de la porción delantera comienza una vez que la absorbancia del pico del eluato atraviesa un primer umbral. En una realización, la recogida de la porción delantera comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza al menos 2,0 UA. En una realización específica, la recogida de la porción delantera comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza al menos 1,5 UA. En otra realización específica, la recogida de la porción delantera comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza al menos 1,0 UA. En otra realización específica, la recogida de la porción delantera comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza al menos 0,5 UA. En aún otras realizaciones específicas, la recogida de la porción delantera comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza al menos 0,1 UA, 0,2 UA, 0,3 UA, 0,4 UA, 0,5 UA, 0,6 UA, 0,7 UA, 0,8 UA, 0,9 UA, 1,0 UA, 1,1 UA, 1,2 UA, 1,3 UA, 1,4 UA, 1,5 UA, 1,6 UA, 1,7 UA, 1,8 UA, 1,9 UA, 2,0 UA, o más.

En algunas realizaciones, una vez se inicia la recogida de la porción delantera, se recoge un número predeterminado de volúmenes de columna antes de cambiar a la recogida (o eliminación) de la porción trasera del eluato. En una realización, no se recogen más de 5 volúmenes de columna (VC) de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recogen más de 4 VC de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recogen más de 3 VC de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recogen más de 2,7 VC de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recogen más de 2,5 VC de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recogen más de 2 VC de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recoge más de 1 VC de eluato en la porción delantera. En aún otras realizaciones, no se recogen más de 0,5 VC, 0,6 VC, 0,7 VC, 0,8 VC, 0,9 VC, 1,0 VC, 1,1 VC, 1,2 VC, 1,3 VC, 1,4 VC, 1,5 VC, 1,6 VC, 1,7 VC, 1,8 VC, 1,9 VC, 2,0 VC, 2,1 VC, 2,2 VC, 2,3 VC, 2,4 VC, 2,5 VC, 2,6 VC, 2,7 VC, 2,8 VC, 2,9 VC, 3,0 VC, 3,1 VC, 3,2 VC, 3,3 VC, 3,4 VC, 3,5 VC, 3,6 VC, 3,7 VC, 3,8 VC, 3,9 VC, 4,0 VC, 4,1 VC, 4,2 VC, 4,3 VC, 4,4 VC, 4,5 VC, 4,6 VC, 4,7 VC, 4,8 VC, 4,9 VC, 5,0 VC, 5,1 VC, 5,2 VC, 5,3 VC, 5,4 VC, 5,5 VC, 5,6 VC, 5,7 VC, 5,8 VC, 5,9 VC, 6,0 VC, o más volúmenes de columna de eluato en la porción delantera.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica (es decir, contaminantes proteicos que tienen actividad amidolítica) en una resina de intercambio catiónico; (b) lavar opcionalmente la resina de intercambio catiónico que tiene proteínas unidas a la misma con un tampón de lavado para retirar contaminantes ligeramente asociados; (c) realizar una elución de una sola etapa de las inmunoglobulinas IgG y la actividad amidolítica; y (d) recoger la porción

delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en no más de 4 volúmenes de columna (VC) del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,5 VC y 3,0 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 3,0 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 3,5 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 4,0 VC del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,5 VC y 3,5 VC del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es de 0,5 VC, 0,6 VC, 0,7 VC, 0,8 VC, 0,9 VC, 1,0 VC, 1,1 VC, 1,2 VC, 1,3 VC, 1,4 VC, 1,5 VC, 1,6 VC, 1,7 VC, 1,8 VC, 1,9 VC, 2,0 VC, 2,1 VC, 2,2 VC, 2,3 VC, 2,4 VC, 2,5 VC, 2,6 VC, 2,7 VC, 2,8 VC, 2,9 VC, 3,0 VC, 3,1 VC, 3,2 VC, 3,3 VC, 3,4 VC, 3,5 VC, 3,6 VC, 3,7 VC, 3,8 VC, 3,9 VC, 4,0 VC, 4,1 VC, 4,2 VC, 4,3 VC, 4,4 VC, 4,5 VC, 4,6 VC, 4,7 VC, 4,8 VC, 4,9 VC, 5,0 VC, 5,1 VC, 5,2 VC, 5,3 VC, 5,4 VC, 5,5 VC, 5,6 VC, 5,7 VC, 5,8 VC, 5,9 VC o 6,0 VC del eluato total. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, la invención proporciona un método para reducir la cantidad de factor XI (FXI) y/o factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción del FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en no más de 4 volúmenes de columna (VC) del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,5 VC y 3,0 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 3,0 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 3,5 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 4,0 VC del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,5 VC y 3,5 VC del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es de 0,5 VC, 0,6 VC, 0,7 VC, 0,8 VC, 0,9 VC, 1,0 VC, 1,1 VC, 1,2 VC, 1,3 VC, 1,4 VC, 1,5 VC, 1,6 VC, 1,7 VC, 1,8 VC, 1,9 VC, 2,0 VC, 2,1 VC, 2,2 VC, 2,3 VC, 2,4 VC, 2,5 VC, 2,6 VC, 2,7 VC, 2,8 VC, 2,9 VC, 3,0 VC, 3,1 VC, 3,2 VC, 3,3 VC, 3,4 VC, 3,5 VC, 3,6 VC, 3,7 VC, 3,8 VC, 3,9 VC, 4,0 VC, 4,1 VC, 4,2 VC, 4,3 VC, 4,4 VC, 4,5 VC, 4,6 VC, 4,7 VC, 4,8 VC, 4,9 VC, 5,0 VC, 5,1 VC, 5,2 VC, 5,3 VC, 5,4 VC, 5,5 VC, 5,6 VC, 5,7 VC, 5,8 VC, 5,9 VC o 6,0 VC del eluato total. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

IV. Reducción de la actividad anticomplemento (AAC)

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos cromatográficos para reducir el contenido en actividad anticomplemento (AAC) de una composición de inmunoglobulinas IgG derivada de plasma. Asimismo, la divulgación también proporciona composiciones de inmunoglobulinas IgG derivadas de plasma que contienen bajos niveles de actividad anticomplemento (AAC) preparadas según los métodos proporcionados en el presente documento. Ventajosamente, los métodos descritos en el presente documento proporcionan composiciones de inmunoglobulinas IgG derivadas de plasma con perfiles de seguridad mejorados. Específicamente, las composiciones proporcionadas por estos métodos tienen potencial reducido para provocar reacciones adversas asociadas con la actividad anticomplementaria, en comparación con las composiciones de inmunoglobulinas IgG fabricadas actualmente (véase, por ejemplo, Buchacher A. *et al.*, *Vox Sang.* Abril de 2010; 98(3 Pt 1):e209-18), cuyo contenido se incorpora expresamente en el presente documento en su totalidad como referencia para todos los propósitos.

A. Métodos de fraccionamiento

La presente divulgación se basa en parte en el descubrimiento de que una mayor parte de la actividad anticomplemento (AAC) presente en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma eluye de una resina de intercambio catiónico en la porción trasera de un eluato creado mediante una elución en etapas, mientras que una mayor parte del contenido en inmunoglobulinas de la fracción eluye en la porción delantera de dicho eluato. Por consiguiente, al recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, la actividad anticomplemento de la preparación de inmunoglobulina resultante se reduce significativamente. Específicamente, se muestra en el presente documento que el contenido en AAC se reduce significativamente en composiciones de inmunoglobulinas preparadas según los métodos proporcionados en el presente documento.

Por consiguiente, en una realización, la presente divulgación proporciona un método para reducir la cantidad de actividad anticomplemento (AAC) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el

método las etapas de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad anticomplemento (es decir, contaminantes que tienen actividad anticomplemento) en una resina de intercambio catiónico; (b) lavar opcionalmente la resina de intercambio catiónico que tiene proteínas unidas a la misma con un tampón de lavado para retirar contaminantes ligeramente asociados; (c) realizar una elución de una sola etapa de las inmunoglobulinas IgG y AAC; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una cantidad reducida de AAC en comparación con la composición de partida, y la porción trasera del eluato contiene una alta concentración de actividad AAC. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, la divulgación proporciona un método para reducir la cantidad de actividad anticomplemento (AAC) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de AAC con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción de la primera cantidad de AAC a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una concentración reducida de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, en comparación con la composición de partida y la porción trasera del eluato contiene una alta concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM). En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm.

En una realización específica, el método comprende las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de AAC con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de entre 4,8 y 5,6 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción de la primera cantidad de AAC a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una cantidad reducida de AAC, en relación con la cantidad de inmunoglobulina IgG, en comparación con la composición de partida, y la porción trasera del eluato contiene una cantidad elevada de AAC, en relación con la cantidad de inmunoglobulina IgG. En una realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,1$. En aún otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es 5,2. En aún otras realizaciones, el pH de la primera condición de disolución es 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, el método comprende las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de AAC con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción de la primera cantidad de AAC a la resina de intercambio catiónico; (b) lavar la resina con las inmunoglobulinas y AAC unidas a la misma con un tampón que tiene una conductividad lo suficientemente baja de manera que las inmunoglobulinas no se eluyen de la resina y un pH de entre 5,1 y 5,9; (c) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una concentración reducida de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulinas IgG, en comparación con la composición de partida, y la porción trasera del eluato contiene una alta concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulinas IgG. En una realización específica, el pH del tampón de lavado es $5,5 \pm 0,3$. En

- otra realización específica, el pH del tampón de lavado es $5,5 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH del tampón de lavado es $5,5 \pm 0,1$. En otra realización específica, el pH del tampón de lavado es 5,5. En aún otras realizaciones, el pH del tampón de lavado es 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).
- En una realización específica, el método comprende las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de AAC con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción de la primera cantidad de AAC a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de $7,8 \pm 0,4$ y una conductividad de al menos 20 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una concentración reducida de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG, en comparación con la composición de partida, y la porción trasera del eluato contiene una alta concentración de AAC, en relación con la concentración de inmunoglobulina IgG. En una realización específica, el pH del tampón de elución es $7,8 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH del tampón de elución es $7,8 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH del tampón de elución es $7,8 \pm 0,1$. En otra realización específica, el pH del tampón de elución es 7,8. En aún otras realizaciones, el pH del tampón de elución es 7,0, 7,1, 7,2, 7,36, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4 u 8,5. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).
- Generalmente, el material de partida usado para los métodos proporcionados en el presente documento incluye cualquier fracción de plasma o composición que comprende inmunoglobulina IgG y actividad anticomplementaria. Como tal, en una realización, se fracciona parcial o completamente plasma según uno cualquiera de los esquemas de purificación conocidos en la técnica. En una realización específica, se fracciona el plasma para producir un precipitado de la fracción I, un precipitado de la fracción II, un precipitado de la fracción I+II+III, un precipitado de la fracción II+III, la fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann, o un precipitado modificado de los mismos, que puede usarse como material de partida para los métodos proporcionados en el presente documento.
- En una realización preferida, se fracciona el plasma mediante una o más etapas de precipitación con etanol. Pueden emplearse etapas de precipitación con etanol para o bien precipitar las inmunoglobulinas deseadas de la disolución, mientras se retiene al menos una proteína distinta de inmunoglobulina en el sobrenadante, o bien precipitar al menos una proteína distinta de inmunoglobulina de la disolución, mientras se retiene la inmunoglobulina deseada en el sobrenadante. Los métodos para el fraccionamiento de inmunoglobulinas de esta manera se conocen bien en la técnica. Los precipitados con etanol a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, un precipitado de la fracción I, un precipitado de la fracción I+II+III, un precipitado de la fracción II+III, la fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann, y precipitados modificados de los mismos. En una realización particularmente preferida, las inmunoglobulinas presentes en el plasma pobre en crioprecipitado se enriquecen mediante un procedimiento con etanol de cuatro etapas, que comprende una etapa de precipitación de la fracción I+II+III, una etapa de precipitación de A, una etapa de precipitación de B y una etapa de precipitación de la fracción II.
- Tal como se demuestra en el presente documento, las características ventajosas de los métodos proporcionados en el presente documento se mantienen cuando se aplican a procedimientos de fabricación a gran escala. Con respecto a la preparación de composiciones de inmunoglobulinas IgG, la fabricación a gran escala se refiere a procedimientos que enriquecen inmunoglobulinas a partir de al menos 100 l de material de partida de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). Generalmente, los procedimientos de fabricación de inmunoglobulinas a gran escala fraccionarán entre 100 l y 20.000 l de plasma combinado por lote. En determinadas realizaciones, un procedimiento de fabricación de inmunoglobulina IgG a gran escala se refiere al fraccionamiento de al menos 100 l de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). En otra realización, un procedimiento de fabricación de inmunoglobulina IgG a gran escala se refiere al fraccionamiento de al menos 500 l de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). En otra realización, un procedimiento de fabricación de inmunoglobulina IgG a gran escala se refiere al fraccionamiento de al menos 1.000 l de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). En otra realización, un procedimiento de fabricación de inmunoglobulina IgG a gran escala se refiere al fraccionamiento de al menos 5000 l de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). En aún otra realización, un procedimiento de fabricación de

inmunoglobulina IgG a gran escala se refiere al fraccionamiento de al menos 10.000 l de plasma combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado).

En una realización, el material de partida para los métodos para reducir la actividad anticomplemento (AAC) proporcionados en el presente documento se prepara mediante fraccionamiento con etanol de plasma humano combinado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitado). En una realización específica, el fraccionamiento con etanol incluye la precipitación de la fracción I+II+III de plasma pobre en crioprecipitado, precipitación de la fracción A de un precipitado de la fracción I+II+III en suspensión, precipitación de la fracción B de un precipitado de la fracción A en suspensión y precipitación de la fracción II de un sobrenadante de la fracción A, tal como se describe a continuación. En otra realización específica, el fraccionamiento con etanol incluye precipitación de la fracción I de plasma pobre en crioprecipitado, precipitación de la fracción II+III de un sobrenadante de la fracción I y precipitación de la fracción II de un precipitado de la fracción II+III en suspensión.

Generalmente, se contemplan métodos que contienen todas las combinaciones de las condiciones de carga, condiciones de lavado y condiciones de elución descritas anteriormente. Además, se contemplan métodos que contienen todas las combinaciones de las condiciones cromatográficas específicas con todos los posibles esquemas para definir y recoger la porción delantera del eluato, tal como se describe a continuación.

1. Porciones delantera y trasera del eluato de intercambio catiónico

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para reducir la actividad anticomplemento (AAC), presente en preparaciones de inmunoglobulina recogiendo la porción delantera de un eluato de intercambio catiónico. Ventajosamente, se muestra en el presente documento que la porción delantera de un eluato formado por elución de una sola etapa de una etapa cromatográfica de intercambio catiónico contiene la mayor parte del contenido en inmunoglobulina deseado, mientras que la porción trasera del eluato contiene la mayor parte de la AAC no deseada. Debido a que la elución de inmunoglobulinas y AAC no puede separarse completamente, debe determinarse una división entre las porciones delantera y trasera del eluato. Deben tenerse en cuenta dos consideraciones principales cuando se realiza esta determinación, concretamente: (i) que según cómo se definan las porciones delantera y trasera del eluato, se recuperará más o menos AAC en la porción delantera -es decir, puede separarse una porción más grande de AAC del contenido en inmunoglobulina cuando se define la porción delantera del eluato como una porción más pequeña del eluato total, y viceversa; y (ii) que según cómo se definan las porciones delantera y trasera del eluato, estarán presentes rendimientos de recuperación de inmunoglobulina mayores o menores en la porción delantera -es decir, se logrará un rendimiento de inmunoglobulina más bajo cuando se define la porción delantera del eluato como una porción más pequeña del eluato total, y viceversa.

Por consiguiente, el experto en la técnica decidirá dónde trazar el límite entre las porciones delantera y trasera del eluato de intercambio catiónico basándose en sus necesidades individuales. Por ejemplo, cuando se prepara una purificación a pequeña escala para investigación o un fin terapéutico especializado, el experto en la técnica podría maximizar la potencia de separación del método recogiendo una porción delantera del eluato más pequeña, mientras que se sacrifica el rendimiento de inmunoglobulina final. En cambio, cuando se realiza fabricación a gran escala (por ejemplo, procesamiento de más de 500 l de plasma pobre en crioprecipitado), el coste de oportunidad puede dictar que se recoja una porción delantera del eluato más grande para aumentar el rendimiento de recuperación de inmunoglobulina a expensas de una reducción más moderada en la AAC de la composición.

En diversas realizaciones, las porciones delantera y trasera del eluato pueden definirse por diversas características, incluyendo sin limitación, el pH del eluato, el rendimiento de proteína (por ejemplo, expresado como porcentaje de la proteína unida a la resina), la concentración de proteína (por ejemplo, tal como se determina mediante la densidad óptica) del eluato, el volumen de eluato, y similares.

a. pH del eluato

Tal como se demuestra en los ejemplos proporcionados en el presente documento, el comienzo de la etapa de elución de intercambio catiónico está marcado por una caída en el pH de la disolución que sale de la columna, hasta un pH por debajo de 5,0, a pesar de que el tampón de elución tiene un pH mayor (generalmente > 7,0) que el de la carga de la columna y las etapas de lavado (generalmente 5,0-6,0). Esta caída en el pH se corresponde con la elución de una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una AAC baja (por ejemplo, véanse la tabla 3, la tabla 11 y la tabla 15). En un momento posterior en la elución, el pH de la disolución que sale de la columna se eleva considerablemente, hasta más de 6,0-8,0. Este cambio en el pH es concomitante con un aumento significativo en el contenido en AAC del eluato (por ejemplo, véanse la tabla 3, la tabla 11 y la tabla 15). Por tanto, aunque se realiza una elución en etapas mediante la aplicación de un solo tampón de elución de pH alto (generalmente mayor de 7,0), el perfil de elución se parece a una elución en dos etapas en la que las inmunoglobulinas IgG se eluyen en primer lugar de la columna, seguido por la actividad anticomplemento acompañante. Por tanto, en determinadas realizaciones, las porciones delantera y trasera del eluato se definen basándose en el pH del eluato en la salida de la columna.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para reducir la cantidad de

actividad anticomplemento (AAC) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad anticomplemento (es decir, contaminantes que tienen actividad anticomplemento) en una resina de intercambio catiónico; (b) lavar opcionalmente la resina de intercambio catiónico que tiene inmunoglobulina IgG y AAC unidas a la misma con un tampón de lavado para retirar contaminantes ligeramente asociados; (c) realizar una elución de una sola etapa de las inmunoglobulinas IgG y AAC; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 7,0. En una realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 6,5. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 6,0. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 5,5. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 5,0. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, o menos. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, la divulgación proporciona un método para reducir la cantidad de actividad anticomplemento (AAC) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de AAC con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción de la AAC a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 7,0. En una realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 6,5. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 6,0. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 5,5. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 5,0. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene un pH de no más de 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, o menos. En una realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,1$. En aún otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es 5,2. En aún otras realizaciones, el pH de la primera condición de disolución es 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

b. Absorbancia del eluato

En aún otra realización particularmente adecuada para la fabricación a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones delantera y trasera del eluato se definen por la concentración de inmunoglobulina que eluye de la columna de intercambio catiónico. Por ejemplo, durante la fabricación a gran escala, la composición de inmunoglobulinas puede cargarse en la resina de intercambio catiónico a cargas de proteína lo suficientemente altas (por ejemplo, > 80 mg de proteína por ml de resina) de manera que el eluato pico esté altamente concentrado. En estos casos, la porción delantera del eluato puede definirse como la fracción del eluato que eluye antes del punto en el que la DO_{280} cae por debajo de un valor umbral. De esta manera, puede recuperarse de manera reproducible aproximadamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a la siguiente, independientemente de pequeñas variaciones entre las series de fabricación. Tal como se demuestra en el ejemplo 9, la aplicación de este esquema de recogida para un procedimiento de fabricación a gran escala da como resultado una recuperación de alto rendimiento de una composición de inmunoglobulinas IgG con un contenido en actividad anticomplemento (AAC) significativamente reducido.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para reducir la cantidad de actividad anticomplemento (AAC) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad anticomplemento (es decir, contaminantes que tienen actividad anticomplemento) en una resina de intercambio catiónico; (b) lavar opcionalmente la resina de intercambio catiónico que tiene proteínas unidas a la misma con un tampón de lavado para retirar contaminantes ligeramente asociados; (c) realizar una elución de una sola etapa de las inmunoglobulinas IgG y AAC; y (d) recoger

la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 0,5 UA. En una realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 1,0 UA. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 1,5 UA.

5 En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 2,0 UA. En aún otras realizaciones específicas, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 0,1 UA, 0,2 UA, 0,3 UA, 0,4 UA, 0,5 UA, 0,6 UA, 0,7 UA, 0,8 UA, 0,9 UA, 1,0 UA, 1,1 UA, 1,2 UA, 1,3 UA, 1,4 UA, 1,5 UA, 1,6 UA, 1,7 UA, 1,8 UA, 1,9 UA, 2,0 UA, o más. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización

10 específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, la divulgación proporciona un método para reducir la cantidad de actividad anticomplemento (AAC) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende

15 inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de AAC con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción de la primera cantidad de AAC a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH

20 de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 0,5 UA. En una realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 1,0 UA. En otra realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 1,5 UA. En otra

25 realización específica, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 2,0 UA. En aún otras realizaciones específicas, la porción delantera del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de al menos 0,1 UA, 0,2 UA, 0,3 UA, 0,4 UA, 0,5 UA, 0,6 UA, 0,7 UA, 0,8 UA, 0,9 UA, 1,0 UA, 1,1 UA, 1,2 UA, 1,3 UA, 1,4 UA, 1,5 UA, 1,6 UA, 1,7 UA, 1,8 UA, 1,9 UA, 2,0 UA, o más. En una realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,1$. En aún otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es 5,2. En aún otras realizaciones, el pH de la primera condición de disolución es 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos

30 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

c. Porcentaje del eluato total

En aún otra realización particularmente adecuada para la fabricación a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones delantera y trasera del eluato se definen como un porcentaje del contenido en proteína total del eluato (por ejemplo, en volumen o proteína total). Al predeterminar el porcentaje del eluato que va a recogerse en la porción delantera, el rendimiento de recuperación de inmunoglobulina puede controlarse estrechamente. Este método para definir las porciones delantera y trasera del eluato es particularmente útil para procedimientos de fabricación que requieren un rendimiento de etapas mínimo y para procedimientos en los que se toma una decisión basándose en sopesar el coste de rendimientos de inmunoglobulina reducidos con el beneficio de producir una composición que tiene un contenido en actividad anticomplemento (AAC) reducido. De esta manera, puede recuperarse de manera reproducible aproximadamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a la siguiente, independientemente de pequeñas variaciones entre las series de fabricación. Tal como se demuestra en el ejemplo 8, la aplicación de este esquema de recogida puede dar como resultado una recuperación de alto rendimiento de una composición de inmunoglobulinas IgG con un contenido en actividad anticomplemento significativamente reducido.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para reducir la cantidad de actividad anticomplemento (AAC) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad anticomplemento (es decir, contaminantes que tienen actividad anticomplemento) en una resina de intercambio catiónico; (b) lavar opcionalmente la resina de intercambio catiónico que tiene proteínas unidas a la misma con un tampón de lavado para retirar contaminantes ligeramente asociados; (c) realizar una elución de una sola etapa de las inmunoglobulinas IgG y AAC; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en no más del 80% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 70% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 70% y el 75% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 75% y el 80% del eluato

total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79% o el 80% del eluato total. En otra realización, la porción delantera (es decir, la fracción recogida o combinada de interés) del eluato es de no más del 70% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y el 70% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 70% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y 65% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 65% y el 70% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69% o el 70% del eluato total. En otra realización, la porción delantera (es decir, la fracción recogida o combinada de interés) del eluato es de no más del 60% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 60% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 55% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 55% y el 60% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 50%, el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59% o el 60% del eluato total. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, la divulgación proporciona un método para reducir la cantidad de actividad anticomplemento (AAC) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de la actividad anticomplemento (AAC) con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción de la primera cantidad de AAC a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en no más del 80% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 70% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 70% y el 75% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 75% y el 80% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79% o el 80% del eluato total. En otra realización, la porción delantera (es decir, la fracción recogida o combinada de interés) del eluato es de no más del 70% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y el 70% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 70% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y 65% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 65% y el 70% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69% o el 70% del eluato total. En otra realización, la porción delantera (es decir, la fracción recogida o combinada de interés) del eluato es de no más del 60% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 60% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 55% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 55% y el 60% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 50%, el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59% o el 60% del eluato total. En una realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,1$. En aún otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es 5,2. En aún otras realizaciones, el pH de la primera condición de disolución es 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

d. Volumen del eluato total

En otra realización particularmente adecuada para la fabricación a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones delantera y trasera del eluato se definen como volúmenes del pico del eluato en relación con el tamaño de la columna de intercambio catiónico (por ejemplo, mediante un número establecido de volúmenes de columna). Al predeterminar un volumen de eluato que va a recogerse en la porción delantera, el rendimiento de recuperación de inmunoglobulina puede controlarse estrechamente y reproducirse. Este método para definir las porciones delantera y trasera del eluato es particularmente útil para procedimientos de fabricación que requieren un rendimiento de etapas mínimo y para procedimientos en los que se toma una decisión basándose en sopesar el coste de rendimientos de inmunoglobulina reducidos con el beneficio de producir una composición que

tiene un contenido en actividad anticomplemento (AAC) reducido. De esta manera, puede recuperarse de manera reproducible aproximadamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a la siguiente, independientemente de pequeñas variaciones entre las series de fabricación. Tal como se demuestra en los ejemplos 11 a 13, la aplicación de este esquema de recogida puede dar como resultado una recuperación de alto rendimiento de una composición de inmunoglobulinas IgG con contenido en actividad anticomplemento reducido.

En una realización, el comienzo de la porción delantera está definido por una absorbancia de referencia. En algunas realizaciones, la recogida de la porción delantera comienza una vez que la absorbancia del pico del eluato atraviesa un primer umbral. En una realización, la recogida de la porción delantera comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza al menos 0,5 UA. En una realización específica, la recogida de la porción delantera comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza al menos 1,0 UA. En otra realización específica, la recogida de la porción delantera comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza al menos 1,5 UA. En otra realización específica, la recogida de la porción delantera comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza al menos 2,0 UA. En aún otras realizaciones específicas, la recogida de la porción delantera comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza al menos 0,1 UA, 0,2 UA, 0,3 UA, 0,4 UA, 0,5 UA, 0,6 UA, 0,7 UA, 0,8 UA, 0,9 UA, 1,0 UA, 1,1 UA, 1,2 UA, 1,3 UA, 1,4 UA, 1,5 UA, 1,6 UA, 1,7 UA, 1,8 UA, 1,9 UA, 2,0 UA, o más.

En algunas realizaciones, una vez se inicia la recogida de la porción delantera, se recoge un número predeterminado de volúmenes de columna antes de cambiar a la recogida (o eliminación) de la porción trasera del eluato. En una realización, no se recogen más de 5 volúmenes de columna (VC) de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recogen más de 4 VC de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recogen más de 3 VC de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recogen más de 2,7 VC de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recogen más de 2,5 VC de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recogen más de 2 VC de eluato en la porción delantera. En otra realización, no se recoge más de 1 VC de eluato en la porción delantera. En aún otras realizaciones, no se recogen más de 0,5 VC, 0,6 VC, 0,7 VC, 0,8 VC, 0,9 VC, 1,0 VC, 1,1 VC, 1,2 VC, 1,3 VC, 1,4 VC, 1,5 VC, 1,6 VC, 1,7 VC, 1,8 VC, 1,9 VC, 2,0 VC, 2,1 VC, 2,2 VC, 2,3 VC, 2,4 VC, 2,5 VC, 2,6 VC, 2,7 VC, 2,8 VC, 2,9 VC, 3,0 VC, 3,1 VC, 3,2 VC, 3,3 VC, 3,4 VC, 3,5 VC, 3,6 VC, 3,7 VC, 3,8 VC, 3,9 VC, 4,0 VC, 4,1 VC, 4,2 VC, 4,3 VC, 4,4 VC, 4,5 VC, 4,6 VC, 4,7 VC, 4,8 VC, 4,9 VC, 5,0 VC, 5,1 VC, 5,2 VC, 5,3 VC, 5,4 VC, 5,5 VC, 5,6 VC, 5,7 VC, 5,8 VC, 5,9 VC, 6,0 VC, o más volúmenes de columna de eluato en la porción delantera.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad anticomplemento (es decir, contaminantes que tienen actividad anticomplemento) en una resina de intercambio catiónico; (b) lavar opcionalmente la resina de intercambio catiónico que tiene proteínas unidas a la misma con un tampón de lavado para retirar contaminantes ligeramente asociados; (c) realizar una elución de una sola etapa de las inmunoglobulinas IgG y AAC; y (d) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en no más de 4 volúmenes de columna (VC) del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,5 VC y 3,0 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 3,0 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 3,5 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 4,0 VC del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,5 VC y 3,5 VC del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es de 0,5 VC, 0,6 VC, 0,7 VC, 0,8 VC, 0,9 VC, 1,0 VC, 1,1 VC, 1,2 VC, 1,3 VC, 1,4 VC, 1,5 VC, 1,6 VC, 1,7 VC, 1,8 VC, 1,9 VC, 2,0 VC, 2,1 VC, 2,2 VC, 2,3 VC, 2,4 VC, 2,5 VC, 2,6 VC, 2,7 VC, 2,8 VC, 2,9 VC, 3,0 VC, 3,1 VC, 3,2 VC, 3,3 VC, 3,4 VC, 3,5 VC, 3,6 VC, 3,7 VC, 3,8 VC, 3,9 VC, 4,0 VC, 4,1 VC, 4,2 VC, 4,3 VC, 4,4 VC, 4,5 VC, 4,6 VC, 4,7 VC, 4,8 VC, 4,9 VC, 5,0 VC, 5,1 VC, 5,2 VC, 5,3 VC, 5,4 VC, 5,5 VC, 5,6 VC, 5,7 VC, 5,8 VC, 5,9 VC o 6,0 VC del eluato total. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

En una realización específica, la divulgación proporciona un método para reducir la cantidad de actividad anticomplemento (AAC) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de: (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de AAC con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y al menos una fracción de la primera cantidad de AAC a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato consiste en no más de 4 volúmenes de columna (VC) del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,5 VC y 3,0 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 3,0 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 3,5 VC del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,0 VC y 4,0 VC del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre 2,5 VC y 3,5 VC del eluato

total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es de 0,5 VC, 0,6 VC, 0,7 VC, 0,8 VC, 0,9 VC, 1,0 VC, 1,1 VC, 1,2 VC, 1,3 VC, 1,4 VC, 1,5 VC, 1,6 VC, 1,7 VC, 1,8 VC, 1,9 VC, 2,0 VC, 2,1 VC, 2,2 VC, 2,3 VC, 2,4 VC, 2,5 VC, 2,6 VC, 2,7 VC, 2,8 VC, 2,9 VC, 3,0 VC, 3,1 VC, 3,2 VC, 3,3 VC, 3,4 VC, 3,5 VC, 3,6 VC, 3,7 VC, 3,8 VC, 3,9 VC, 4,0 VC, 4,1 VC, 4,2 VC, 4,3 VC, 4,4 VC, 4,5 VC, 4,6 VC, 4,7 VC, 4,8 VC, 4,9 VC, 5,0 VC, 5,1 VC, 5,2 VC, 5,3 VC, 5,4 VC, 5,5 VC, 5,6 VC, 5,7 VC, 5,8 VC, 5,9 VC o 6,0 VC del eluato total. En una realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,1$. En aún otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es 5,2. En aún otras realizaciones, el pH de la primera condición de disolución es 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

V. Preparación de plasma pobre en crioprecipitado

El material de partida usado para la preparación de composiciones de IgG concentradas generalmente consiste en o bien plasma recuperado (es decir, plasma que se ha separado de sangre completa *ex vivo*) o plasma original (es decir, plasma recogido mediante plasmaféresis). El procedimiento de purificación normalmente empieza con la descongelación de plasma combinado previamente congelado, que ya se ha sometido a ensayo para determinar consideraciones de seguridad y calidad. La descongelación normalmente se lleva a cabo a una temperatura no mayor de 6°C, preferiblemente entre -1°C y 6°C. Tras la descongelación completa del plasma congelado a baja temperatura, se realiza centrifugación en frío (por ejemplo, $\leq 6^\circ\text{C}$, preferiblemente $2,5 \pm 3,5^\circ\text{C}$) para separar crioprecipitados sólidos del sobrenadante líquido. Alternativamente, puede realizarse la etapa de separación mediante filtración en vez de centrifugación. Entonces el sobrenadante líquido (también denominado "plasma pobre en crioprecipitado", tras la retirada de proteínas insolubles en frío mediante centrifugación de plasma recién descongelado) se procesa en la siguiente etapa. Pueden adoptarse diversas etapas adicionales en este momento para el aislamiento de la actividad de corrección del inhibidor de factor VIII (FEIBA), el complejo del factor IX, el concentrado del factor VII o el complejo de antitrombina III. Por ejemplo, pueden adsorberse uno o más factores sanguíneos del plasma pobre en crioprecipitado antes de enriquecer adicionalmente la disolución que contiene inmunoglobulina.

VI. Fraccionamiento de plasma pobre en crioprecipitado

Con el fin de preparar una composición de inmunoglobulinas IgG, se fracciona comúnmente plasma pobre en crioprecipitado para separar las inmunoglobulinas deseadas de otras proteínas e impurezas presentes. Se conocen muchos métodos para el fraccionamiento de plasma en la técnica, incluyendo fraccionamiento con alcohol (por ejemplo, etanol), precipitación con polímero (por ejemplo, PEG), precipitación con ácido graso y éster (por ejemplo, caprilato), cromatografía, y similares. Los ejemplos de estos procedimientos de fraccionamiento incluyen, sin limitación, fraccionamientos de Cohn (J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3): 459-475; J. Am. Chem. Soc. 72:465-474 (1950)), fraccionamientos de Oncley (J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2): 541-550), purificaciones de Deutsch (J. Biol. Chem. 164:109-118), purificaciones de Hoppe (Munch Med Wochenschr 1967 (34): 1749-1752), purificaciones de Falksveden (patente sueca n.º 348942), purificaciones de Falksveden y Lundblad (Methods of Plasma Protein Fractionation 1980), purificaciones de Lebing (Vox Sang 2003 (84):193-201), purificaciones de Tanaka (Braz J Med Biol Res 2000 (33)37-30)), purificaciones de Teschner (Vox Sang, 2007 (92):42-55), fraccionamientos de Nitschmann (Helv. Chim. Acta 37:866-873), fraccionamientos de Kistler/Nitschmann (Vox Sang. 7:414-424 (1962)), purificaciones de Barundern (Vox Sang. 7:157-74 (1962)), purificaciones de Koblet (Vox Sang. 13:93-102 (1967)) un procedimiento de purificación divulgado en las patentes estadounidenses n.ºs 5.122.373 o 5.177.194, procedimientos modificados de los mismos, y procedimientos de purificación similares o equivalentes conocidos en la técnica.

Generalmente, los métodos proporcionados en el presente documento son compatibles con cualquiera de los esquemas de purificación señalados anteriormente. Como tal, en una realización, se fracciona parcial o completamente plasma pobre en crioprecipitado según uno cualquiera de los esquemas de purificación mencionados anteriormente. En una realización específica, se fracciona parcialmente plasma pobre en crioprecipitado según una o más etapas de fraccionamiento divulgadas en las enseñanzas descritas anteriormente, para producir una composición intermedia de fraccionamiento. En una realización más específica, se fracciona plasma pobre en crioprecipitado para producir un precipitado de la fracción I, un precipitado de la fracción II, un precipitado de la fracción I+II+III, un precipitado de la fracción II+III, la fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann, o un precipitado modificado de los mismos.

En una realización preferida, se fracciona plasma pobre en crioprecipitado mediante una o más etapas de precipitación con etanol. Pueden emplearse etapas de precipitación con etanol para o bien precipitar las inmunoglobulinas deseadas de la disolución, mientras se retiene al menos una proteína distinta de inmunoglobulina en el sobrenadante, o bien precipitar al menos una proteína distinta de inmunoglobulina de la disolución, mientras se retiene la inmunoglobulina deseada en el sobrenadante. Los métodos para el fraccionamiento de inmunoglobulinas

de esta manera se conocen bien en la técnica. Los precipitados con etanol a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, un precipitado de la fracción I, un precipitado de la fracción I+II+III, un precipitado de la fracción II+III, la fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann y precipitados modificados de los mismos. En una realización particularmente preferida, las inmunoglobulinas presentes en el plasma pobre en crioprecipitado se enriquecen mediante un procedimiento con etanol de cuatro etapas, que comprende una etapa de precipitación de la fracción I+II+III, una etapa de precipitación de A, una etapa de precipitación de B, y una etapa de precipitación de la fracción II, tal como se describe a continuación.

VII. Esquemas de fraccionamiento a modo de ejemplo

Aunque el experto en la técnica apreciará que pueden usarse muchos materiales de partida diferentes (por ejemplo, diferentes fracciones de plasma) para realizar los métodos proporcionados en el presente documento para reducir la actividad amidolítica (por ejemplo, contenido en factor XI y/o factor XIa) y/o actividad anticomplemento (AAC), se proporciona un esquema de fraccionamiento a modo de ejemplo a continuación. El esquema de fraccionamiento a modo de ejemplo emplea cuatro reacciones de precipitación con etanol para preparar una precipitación de la fracción II que puede resuspenderse y posteriormente usarse como material de partida para los métodos proporcionados en el presente documento. La composición de inmunoglobulinas IgG enriquecida resultante puede enriquecerse adicionalmente mediante procesamiento posterior usando técnicas tales como cromatografía de intercambio aniónico, ultra/diafiltración, etapas de inactivación y/o retirada de virus, y otras etapas de enriquecimiento bien conocidas en la técnica.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un método para fabricar una composición de inmunoglobulinas IgG, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar una fracción de plasma pobre en crioprecipitado; (b) precipitar inmunoglobulinas de la fracción de plasma pobre en crioprecipitado en una primera reacción de precipitación mezclando etanol con la fracción de plasma pobre en crioprecipitado a una concentración final de entre el 17% y el 23% (v/v) a un pH de entre 6,5 y 7,3 y una temperatura de entre -8°C y -2°C, formando así un primer precipitado y un primer sobrenadante; (c) resuspender inmunoglobulinas presentes en el primer precipitado, formando así una primera suspensión; (d) precipitar inmunoglobulinas de la primera suspensión en una segunda reacción de precipitación mezclando etanol con la fracción de plasma pobre en crioprecipitado a una concentración final de entre el 17% y el 23% (v/v) a un pH de entre 6,8 y 7,6 y una temperatura de entre -8°C y -2°C, formando así un segundo precipitado y un segundo sobrenadante; (e) resuspender inmunoglobulinas presentes en el segundo precipitado, formando así una segunda suspensión; (f) precipitar inmunoglobulinas de la segunda suspensión en una tercera reacción de precipitación mezclando etanol con la fracción de plasma pobre en crioprecipitado a una concentración final de entre el 14% y el 20% (v/v) a un pH de entre 5,0 y 5,8 y una temperatura de entre -8°C y -2°C, formando así un tercer precipitado y un tercer sobrenadante; (g) precipitar inmunoglobulinas del tercer sobrenadante en una cuarta reacción de precipitación mezclando etanol con la fracción de plasma pobre en crioprecipitado a una concentración final de entre el 22% y el 28% (v/v) a un pH de entre 6,7 y 7,5 y una temperatura de entre -8°C y -2°C, formando así un cuarto precipitado y un cuarto sobrenadante; (h) resuspender el cuarto precipitado para formar una tercera suspensión; (i) poner en contacto la tercera suspensión con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas IgG y al menos uno de: (i) una fracción del FXI y/o FXIa, y (ii) una primera cantidad de la actividad anticomplemento (AAC), a la resina de intercambio catiónico; (j) eluir las inmunoglobulinas IgG de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato que comprende una porción delantera y una porción trasera; y (k) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato. En una realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es de $5,2 \pm 0,1$. En aún otra realización específica, el pH de la primera condición de disolución es 5,2. En aún otras realizaciones, el pH de la primera condición de disolución es 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 22 mS/cm. En aún otra realización específica, el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 25 mS/cm. En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

A. Esquema de fraccionamiento anterior I

En un primer esquema de purificación anterior a modo de ejemplo, se somete plasma que contiene inmunoglobulina IgG a fraccionamiento con alcohol (por ejemplo, fraccionamiento con etanol) tal como se describe a continuación. En una realización, este primer esquema de fraccionamiento anterior incluye una etapa de precipitación de la fracción I+II+III, una etapa de precipitación de la fracción A y una etapa de precipitación de la fracción B antes de la etapa de precipitación de la fracción II que finalmente proporciona el material de partida para los métodos cromatográficos de intercambio catiónico proporcionados en el presente documento para la reducción de la actividad amidolítica (por ejemplo, factor XI/XIa) y/o actividad anticomplemento (AAC).

Se contemplan métodos que contienen todas las combinaciones de condiciones de precipitación (por ejemplo, concentración de etanol, pH, temperatura, técnica de separación) para cada una de las etapas de precipitación de la fracción I+II+III, fracción A, fracción B y fracción II tal como se describe a continuación. Además, se contemplan métodos que contienen todas las combinaciones de las condiciones de precipitación específicas con todos los posibles esquemas para definir y recoger la porción delantera del eluato, tal como se describe a continuación.

1. Precipitación de la fracción I+II+III

En una realización, se forma una precipitación de la fracción I+II+III añadiendo etanol a plasma pobre en crioprecipitado a una concentración final de entre el 17% y el 23% (v/v) a un pH de entre 6,5 y 7,3. La mezcla se incubaba entonces mientras se agita a entre -8°C y -2°C. El precipitado de la fracción I+II+III resultante puede separarse del sobrenadante de la fracción I+II+III mediante centrifugación o filtración de la mezcla, que se realiza generalmente en frío. La mayor parte del contenido en inmunoglobulina está presente en el precipitado de la fracción I+II+III, que puede resuspenderse y enriquecerse adicionalmente.

En una realización específica, la concentración final de etanol en la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es del $20 \pm 3\%$ (v/v). En otra realización, la concentración final de etanol es del $20 \pm 2\%$ (v/v). En otra realización, la concentración final de etanol es del $20 \pm 1\%$ (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 20% (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 21%, el 22% o el 23% (v/v).

En una realización específica, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es de $6,9 \pm 0,4$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es de $6,9 \pm 0,3$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es de $6,9 \pm 0,2$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es de $6,9 \pm 0,1$. En aún otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es 6,9. En aún otras realizaciones, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2 o 7,3.

En una realización específica, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es de $-5 \pm 3^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es de $-5 \pm 2^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es de $-5 \pm 1^\circ\text{C}$. En aún otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es de -5°C . En aún otras realizaciones, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción I+II+III es de -8°C , -7°C , -6°C , -5°C , -4°C , -3°C o -2°C .

En una realización específica, el plasma pobre en crioprecipitado se ajusta a un pH de $6,9 \pm 0,2$ y se calcula que la concentración de alcohol es del 20% (v/v) mediante la adición de un tampón de resuspensión que contiene acetato de sodio trihidratado, ácido acético glacial, y agua para inyección (pH 4,0) y alcohol etílico desnaturalizado (fórmula SDA-3A). El tampón se añade con la cantidad requerida de alcohol con mezclado minucioso. El alcohol se enfría hasta una temperatura de -15°C o más fría antes de la adición a plasma pobre en crioprecipitado. El tampón y el alcohol se añaden al plasma mientras que el tanque de suspensión se enfría hasta una temperatura de $-5 \pm 2^\circ\text{C}$. Tras completarse la adición, se comprueba el pH de la disolución y se ajusta a $6,9 \pm 0,2$ si se requiere con disolución de bicarbonato de sodio o tampón de pH 4,0. Entonces se centrifuga la suspensión de la fracción I+II+III para separar el precipitado del sobrenadante.

2. Precipitación de la fracción A

Para enriquecer adicionalmente el contenido y la pureza de IgG, en una realización, se resuspende un precipitado de la fracción I+II+III y se realiza una segunda etapa de precipitación (precipitación de la fracción A). Se realiza precipitación de la fracción A añadiendo etanol a la suspensión de la fracción I+II+III hasta una concentración final de entre el 17% y el 23% (v/v) a un pH de entre 6,8 y 7,6. La mezcla se incubaba entonces mientras se agita a de entre -8°C y -2°C . El precipitado de la fracción A resultante puede separarse del sobrenadante de la fracción A mediante centrifugación o filtración de la mezcla, que se realiza generalmente en frío. La mayor parte del contenido en inmunoglobulina está presente en el precipitado de la fracción A, que puede resuspenderse y enriquecerse adicionalmente.

En una realización específica, la concentración final de etanol en la etapa de precipitación de la fracción A es del $20 \pm 3\%$ (v/v). En otra realización, la concentración final de etanol es del $20 \pm 2\%$ (v/v). En otra realización, la concentración final de etanol es del $20 \pm 1\%$ (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 20% (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 21%, el 22% o el 23% (v/v).

En una realización específica, el pH de la etapa de precipitación de la fracción A es $7,2 \pm 0,4$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción A es $7,2 \pm 0,3$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción A es $7,2 \pm 0,2$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción A es $7,2 \pm 0,1$. En

aún otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción A es 7,2. En aún otras realizaciones, el pH de la etapa de precipitación de la fracción A es 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 o 7,6.

5 En una realización específica, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción A es de $-5 \pm 3^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción A es de $-5 \pm 2^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción A es de $-5 \pm 1^\circ\text{C}$. En aún otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción A es de -5°C . En aún otras realizaciones, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción A es de -8°C , -7°C , -6°C , -5°C , -4°C , -3°C o -2°C .

10 En una realización específica, el precipitado de la fracción I+II+III se suspende en tampón de resuspensión frío que contiene acetato de sodio trihidratado, ácido acético glacial y agua para inyección (pH 4,0) y se mezcla. La suspensión se diluye con WFI para lograr una concentración de proteína calculada del $1,0 \pm 0,3\%$ (p/v). Se continúa la agitación hasta que la suspensión es homogénea. La disolución se ajusta a un pH de $7,2 \pm 0,2$ con tampón (pH 4,0) o con fosfato de disodio 0,25 M y se lleva hasta una concentración de alcohol calculada del 20% (v/v). El alcohol se enfría hasta una temperatura de -15°C o más fría antes de la adición a la disolución. El alcohol frío se añade mientras que se enfría el tanque hasta $-5 \pm 2^\circ\text{C}$. Tras completarse la adición, se comprueba el pH de la suspensión y se ajusta a $7,2 \pm 0,2$ si se requiere. Entonces se filtra el precipitado formado (denominado precipitado de la fracción A) para separar el precipitado del sobrenadante.

20 3. Precipitación de la fracción B

Para enriquecer adicionalmente el contenido y la pureza de IgG, en una realización, se resuspende un precipitado de la fracción A y se realiza una tercera etapa de precipitación (precipitación de la fracción B). Se realiza la precipitación de la fracción B añadiendo etanol a la suspensión de la fracción A hasta una concentración final de entre el 14% y el 20% (v/v) a un pH de entre 5,0 y 5,8. La mezcla se incuba entonces mientras se agita a de entre -8°C y -2°C . El precipitado de la fracción B resultante puede separarse del sobrenadante de la fracción B mediante centrifugación o filtración de la mezcla, que se realiza generalmente en frío. La mayor parte del contenido en inmunoglobulina está presente en el sobrenadante de la fracción B, que puede recuperarse y enriquecerse adicionalmente.

30 En una realización específica, la concentración final de etanol en la etapa de precipitación de la fracción B es del $17 \pm 3\%$ (v/v). En otra realización, la concentración final de etanol es del $17 \pm 2\%$ (v/v). En otra realización, la concentración final de etanol es del $17 \pm 1\%$ (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 17% (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19% o el 20% (v/v).

40 En una realización específica, el pH de la etapa de precipitación de la fracción B es de $5,4 \pm 0,4$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción B es de $5,4 \pm 0,3$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción B es de $5,4 \pm 0,2$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción B es de $5,4 \pm 0,1$. En aún otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción B es 5,4. En aún otras realizaciones, el pH de la etapa de precipitación de la fracción B es 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7 o 5,8.

45 En una realización específica, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción A es de $-5 \pm 3^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción A es de $-5 \pm 2^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción A es de $-5 \pm 1^\circ\text{C}$. En aún otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción A es de -5°C . En aún otras realizaciones, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción A es de -8°C , -7°C , -6°C , -5°C , -4°C , -3°C o -2°C .

50 En una realización específica, se suspende un precipitado de la fracción A en agua fría para inyección (WFI) y se agita durante al menos una hora. Cuando el precipitado se suspende minuciosamente, se añade un tampón que contiene acetato de sodio. La agitación continúa hasta que la suspensión es homogénea. El pH se ajusta a $5,4 \pm 0,2$ con tampón pH 4,0 (acetato de sodio trihidratado 109 g/l, ácido acético glacial 240 g/l y WFI) o fosfato de disodio 0,25 M. La suspensión se diluye con WFI fría calculada para lograr una concentración de proteína del $1,2 \pm 0,3\%$ (p/v). La agitación continúa hasta que la suspensión es homogénea. El contenido en alcohol se lleva hasta una concentración calculada para que sea del 17% (v/v) añadiendo alcohol enfriado bruscamente de manera previa hasta -15°C o menos. El alcohol frío se añade mientras que se enfría el tanque hasta $-5 \pm 2^\circ\text{C}$. Si es necesario, se reajusta el pH hasta $5,4 \pm 0,2$ con tampón de pH 4,0 o fosfato de disodio 0,25 M. El precipitado formado, el precipitado de la fracción B, se separa mediante filtración usando un filtro de profundidad. El filtrado de la fracción B (es decir, sobrenadante) se recupera para enriquecimiento adicional.

60 B. Esquema de fraccionamiento anterior II

En un segundo esquema de purificación anterior a modo de ejemplo, se somete plasma que contiene inmunoglobulina IgG a fraccionamiento con alcohol (por ejemplo, fraccionamiento con etanol) tal como se describe a

continuación. En una realización, este primer esquema de fraccionamiento anterior incluye una etapa de precipitación de la fracción I y una etapa de precipitación de la fracción II+III antes de la etapa de precipitación de la fracción II que finalmente proporciona el material de partida para los métodos cromatográficos de intercambio catiónico proporcionados en el presente documento para la reducción de la actividad amidolítica (por ejemplo, factor XI/XIa) y/o actividad anticomplemento (AAC).

Se contemplan métodos que contienen todas las combinaciones de condiciones de precipitación (por ejemplo, concentración de etanol, pH, temperatura, técnica de separación) para cada una de las etapas de precipitación de la fracción I, fracción II+III y fracción II tal como se describe a continuación. Además, se contemplan métodos que contienen todas las combinaciones de las condiciones de precipitación específicas con todos los posibles esquemas para definir y recoger la porción delantera del eluato, tal como se describe a continuación.

1. Precipitación de la fracción I

En una realización, se forma una precipitación de la fracción I añadiendo etanol a plasma pobre en crioprecipitado a una concentración final de desde el 6% hasta el 10% (v/v) a un pH desde 6,7 hasta 7,3. La mezcla se incuba entonces mientras se agita a de desde -4°C hasta 2°C. El precipitado de la fracción I resultante puede separarse del sobrenadante de la fracción I mediante centrifugación o filtración de la mezcla, que se realiza generalmente en frío. La mayor parte del contenido en inmunoglobulina está presente en el sobrenadante de la fracción I, que puede recuperarse y enriquecerse adicionalmente.

En una realización específica, la concentración final de etanol en la etapa de precipitación de la fracción I es del $8 \pm 2\%$ (v/v). En otra realización, la concentración final de etanol es del $8 \pm 1\%$ (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 8% (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 6%, el 7%, el 8%, el 9% o el 10% (v/v).

En una realización específica, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I es de $7,0 \pm 0,4$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I es de $7,0 \pm 0,3$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I es de $7,0 \pm 0,2$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I es de $7,0 \pm 0,1$. En aún otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I es 7,0. En aún otras realizaciones, el pH de la etapa de precipitación de la fracción I es 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2 ó 7,3.

En una realización específica, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción I es de $-1 \pm 3^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción I es de $-1 \pm 2^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción I es de $-1 \pm 1^\circ\text{C}$. En aún otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción I es de -1°C . En aún otras realizaciones, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción I es de -4°C , -3°C , -2°C , -1°C , 0°C , 1°C o 2°C .

En una realización específica, el plasma pobre en crioprecipitado se ajusta a un pH de $7,0 \pm 0,1$ y una concentración de alcohol que se calcula que es del 8% (v/v). Las disoluciones usadas para ajustar el pH y las concentraciones de alcohol se añaden con mezclado minucioso. La temperatura de la reacción de precipitación se reduce y se mantiene a $-1 \pm 1^\circ\text{C}$. Entonces la suspensión de la fracción I resultante se centrifuga o filtra para separar el precipitado del sobrenadante.

2. Precipitación de la fracción II+III

Para enriquecer adicionalmente el contenido y la pureza de IgG, en una realización, se usa un sobrenadante de la fracción I como material para una segunda etapa de precipitación (precipitación de la fracción II+III). Se realiza precipitación de la fracción II+III añadiendo etanol al sobrenadante de la fracción I hasta una concentración final de desde el 22% hasta el 28% (v/v) a un pH de entre 6,7 y 7,3. La mezcla se incuba entonces mientras se agita a entre -10°C y -4°C . El precipitado de la fracción II+III resultante puede separarse del sobrenadante de la fracción II+III mediante centrifugación o filtración de la mezcla, que se realiza generalmente en frío. La mayor parte del contenido en inmunoglobulina está presente en el precipitado de la fracción II+III, que puede resuspenderse y enriquecerse adicionalmente.

En una realización específica, la concentración final de etanol en la etapa de precipitación de la fracción II+III es del $25 \pm 3\%$ (v/v). En otra realización, la concentración final de etanol es del $25 \pm 2\%$ (v/v). En otra realización, la concentración final de etanol es del $25 \pm 1\%$ (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 25% (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 22%, el 23%, el 24%, el 25%, el 26%, el 27% o el 28% (v/v).

En una realización específica, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II+III es de $7,0 \pm 0,4$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II+III es de $7,0 \pm 0,3$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II+III es de $7,0 \pm 0,2$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II+III es de $7,0 \pm 0,1$. En aún otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II+III es 7,0.

En aún otras realizaciones, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II+III es 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 ó 7,4.

5 En una realización específica, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II+III es de $-7 \pm 3^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II+III es de $-7 \pm 2^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II+III es de $-7 \pm 1^\circ\text{C}$. En aún otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II+III es de -7°C . En aún otras realizaciones, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II+III es de -10°C , -9°C , -8°C , -7°C , -6°C , -5°C o -4°C .

10 En una realización específica, el sobrenadante de la fracción I se ajusta a un pH de $7,0 \pm 0,1$ y se calcula que la concentración de alcohol es del 25% (v/v). Las disoluciones usadas para ajustar el pH y las concentraciones de alcohol se añaden con mezclado minucioso. La temperatura de la reacción de precipitación se reduce y se mantiene a $-6 \pm 2^\circ\text{C}$. Entonces se centrifuga o se filtra la suspensión de la fracción II+III resultante para separar el precipitado del sobrenadante.

15 C. Precipitación de la fracción II

Para enriquecer adicionalmente el contenido y la pureza de IgG, en una realización, se realiza una cuarta (tras el esquema de fraccionamiento anterior I) o tercera (tras el esquema de fraccionamiento anterior II) etapa de precipitación con alcohol (precipitación de la fracción II). Se realiza la precipitación de la fracción II ajustando el pH de una suspensión del filtrado de la fracción B o precipitado de la fracción II+III hasta entre 6,7 y 7,5 y añadiendo etanol hasta una concentración final de entre el 22% y el 28% (v/v). La mezcla se incuba entonces mientras se agita a entre -13°C hasta -2°C . El precipitado de la fracción II resultante puede separarse del sobrenadante de la fracción B mediante centrifugación o filtración de la mezcla, que se realiza generalmente en frío. La mayor parte del contenido en inmunoglobulina está presente en el precipitado de la fracción II, que puede resuspenderse y enriquecerse adicionalmente.

20 En una realización específica, la concentración final de etanol en la etapa de precipitación de la fracción II es de $25 \pm 3\%$ (v/v). En otra realización, la concentración final de etanol es del $25 \pm 2\%$ (v/v). En otra realización, la concentración final de etanol es del $25 \pm 1\%$ (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 25% (v/v). En aún otra realización, la concentración final de etanol es del 22%, el 23%, el 24%, el 25%, el 26%, el 27% o el 28% (v/v).

35 En una realización específica, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II es $7,1 \pm 0,4$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II es $7,1 \pm 0,3$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II es $7,1 \pm 0,2$. En otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II es $7,1 \pm 0,1$. En aún otra realización, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II es 7,1. En aún otras realizaciones, el pH de la etapa de precipitación de la fracción II es 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ó 7,5.

40 En una realización específica, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II es de $-5 \pm 3^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II es de $-5 \pm 2^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II es de $-5 \pm 1^\circ\text{C}$. En aún otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II es de -5°C . En otra realización específica, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II es de $-10 \pm 3^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II es de $-10 \pm 2^\circ\text{C}$. En otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II es de $-10 \pm 1^\circ\text{C}$. En aún otra realización, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II es de -10°C . En aún otras realizaciones, la temperatura de la etapa de precipitación de la fracción II es de -13 , -12 , -11 , -10 , -9 , -8°C , -7°C , -6°C , -5°C , -4°C , -3°C ó -2°C .

50 En una realización específica, se ajusta el pH del filtrado de la fracción B hasta $7,1 \pm 0,2$ usando disolución de bicarbonato de sodio 1,0 M. Se añade alcohol adicional con mezclado hasta llevar la concentración calculada hasta el 25% (v/v). Se comprueba el pH y se reajusta, si es necesario, hasta $7,3 \pm 0,2$ usando bicarbonato de sodio 1 M o tampón pH 4,0. Se agita la suspensión durante al menos dos horas a una temperatura de $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ tras finalizar la adición de alcohol. Tras finalizar la agitación, se reajusta el pH hasta $7,3 \pm 0,2$, si se requiere. Se centrifuga la suspensión y se separa el precipitado, el precipitado de la fracción II.

55 D. Cromatografía de intercambio catiónico

60 Para enriquecer adicionalmente la composición de inmunoglobulinas, en una realización, puede resuspenderse un precipitado de la fracción II en agua o un tampón de baja fuerza iónica y someterse a cromatografía de intercambio catiónico. En una realización, el precipitado de la fracción II se resuspende en agua o tampón de baja fuerza iónica a un pH por debajo de 6,0. Normalmente, el pH del precipitado de la fracción II resuspendido es $5,2 \pm 0,2$ y la conductividad de la suspensión es baja, normalmente no más de 1 mS/cm. Entonces se filtra la suspensión de la fracción II para retirar material no solubilizado antes de cargarlo en una resina de intercambio catiónico, equilibrada a

un pH por debajo de 6,0. Tras cargar las inmunoglobulinas en la resina de intercambio catiónico (por ejemplo, una columna de intercambio catiónico), puede lavarse la resina con un tampón de lavado que tiene un pH por debajo de 6,0. Para eluir las inmunoglobulinas, la resina de intercambio catiónico se pone entonces en contacto con un tampón de elución que tiene una conductividad de al menos 15 mS/cm (por ejemplo, con una concentración de sal de al menos NaCl 15 mM o una sal equivalente de la misma) y pH superior a 7,0. En una realización específica, el precipitado de la fracción II suspendido se somete a tratamiento con disolvente y detergente (D/D) antes de realizar cromatografía de intercambio catiónico. Aunque se usa un precipitado de la fracción II resuspendido del esquema de fraccionamiento a modo de ejemplo presentado en el presente documento como el material de partida para los métodos de intercambio catiónico proporcionados en el presente documento, se apreciará que cualquier composición (es decir, fracción) de inmunoglobulinas derivada de plasma que contenga inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica (por ejemplo, FXI y/o FXIa) y/o actividad anticomplemento (AAC) puede usarse en los métodos proporcionados en el presente documento.

Se ha encontrado que altos niveles de actividad amidolítica (por ejemplo, FXI y/o FXIa) y/o actividad anticomplemento (AAC) se coeluyen con IgG de la resina de intercambio catiónico. La incapacidad para separar cantidades significativas de estas impurezas de las inmunoglobulinas deseadas da como resultado una composición de IgG final con alta actividad amidolítica y/o alta actividad anticomplemento. Dado el riesgo aumentado de acontecimientos tromboembólicos que se ha atribuido a alta actividad amidolítica en preparaciones farmacéuticas de inmunoglobulina, y reacciones adversas que se han asociado con actividad anticomplemento, sigue habiendo una necesidad en el campo para la retirada de impurezas que contribuyen a la actividad amidolítica (por ejemplo, FXI/FXIa) y/o actividad anticomplemento (AAC) presente en muchos productos de IgG. Ventajosamente, se ha encontrado que cuando se usa un tampón que tiene un pH por encima de 7,0 para eluir inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico, la actividad amidolítica y la actividad anticomplemento (AAC) eluyen solo en la porción trasera del eluato. En particular, la elución de la actividad amidolítica y AAC en la porción trasera del eluato se corresponde con un cambio en el pH del eluato, desde por debajo de 6,0 hasta por encima de 7,0. Como tal, la porción delantera del eluato contiene una alta concentración de inmunoglobulinas y baja concentración de actividad amidolítica y AAC, mientras que la porción trasera del eluato tiene una concentración de inmunoglobulina menor y actividad amidolítica y AAC mayor. Por consiguiente, en realizaciones preferidas de los métodos proporcionados en el presente documento, la porción delantera del eluato de intercambio catiónico se recoge por separado de la porción trasera del eluato.

En determinadas realizaciones, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. Las resinas de intercambio catiónico débiles a modo de ejemplo incluyen aquellas con un ligando de ácido carboxílico, por ejemplo, resinas de carboximetilo (CM). En una realización preferida, la resina de intercambio catiónico usada en los métodos proporcionados en el presente documento es una resina de carboximetilo, por ejemplo, CM-Sefarosa.

En una realización, se resuspende el precipitado de la fracción II con agua fría o un tampón de baja fuerza iónica a un pH de entre 4,8 y 5,6. En una realización específica, el pH del agua o tampón usados para la resuspensión es de $5,2 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH del agua o tampón usados para la resuspensión es de $5,2 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH del agua o tampón usados para la resuspensión es de $5,2 \pm 0,1$. En aún otra realización específica, el pH del agua o tampón usado para la resuspensión es de 5,2. En aún otras realizaciones, el pH del agua o tampón usado para la resuspensión es de 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0.

En una realización, la resina de intercambio catiónico se equilibra previamente hasta un pH de entre 4,6 y 5,6. En una realización específica, la resina se equilibra previamente hasta un pH de entre 4,6 y 5,5. En otra realización específica, la resina se equilibra previamente hasta pH $5,0 \pm 0,4$. En otra realización específica, la resina se equilibra previamente hasta pH $5,0 \pm 0,3$. En otra realización específica, la resina se equilibra previamente hasta pH $5,0 \pm 0,2$. En otra realización específica, la resina se equilibra previamente hasta pH $5,0 \pm 0,1$. En otra realización específica, la resina se equilibra previamente hasta pH 5,0. En aún otras realizaciones, la resina se equilibra previamente hasta pH 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0.

En una realización, tras cargar una suspensión de la fracción II clarificada en la resina de intercambio catiónico, la resina se lava con un tampón que tiene una conductividad lo suficientemente baja de manera que las inmunoglobulinas no se eluyen de la resina y un pH de entre 5,1 y 5,9. En una realización específica, el pH del tampón de lavado es $5,5 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH del tampón de lavado es $5,5 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH del tampón de lavado es $5,5 \pm 0,1$. En otra realización específica, el pH del tampón de lavado es 5,5. En aún otras realizaciones, el pH del tampón de lavado es 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0.

En una realización, el pH del tampón de elución es mayor de 7,5. En otra realización, el pH del tampón de elución es de entre 7,4 y 8,2. En una realización específica, el pH del tampón de elución es $7,8 \pm 0,3$. En otra realización específica, el pH del tampón de elución es $7,8 \pm 0,2$. En otra realización específica, el pH del tampón de elución es $7,8 \pm 0,1$. En otra realización específica, el pH del tampón de elución es 7,8. En aún otras realizaciones, el pH del tampón de elución es 7,0, 7,1, 7,2, 7,36, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4 u 8,5.

En una realización específica, la conductividad del tampón de elución es de al menos 10 mS/cm. En una realización preferida, la conductividad del tampón de elución es de al menos 15 mS/cm. En otra realización preferida, la conductividad del tampón de elución es de al menos 20 mS/cm. En una realización específica, la conductividad del tampón de elución es de entre 10 mS/cm y 40 mS/cm. En otra realización, la conductividad del tampón de elución es de entre 15 mS/cm y 30 mS/cm. En otra realización, la conductividad del tampón de elución es de entre 20 mS/cm y 30 mS/cm. En otra realización, la conductividad del tampón de elución es de entre 25 mS/cm y 30 mS/cm. En aún otras realizaciones, la conductividad del tampón de elución es de aproximadamente 5 mS/cm, o aproximadamente 6 mS/cm, 7 mS/cm, 8 mS/cm, 9 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17 mS/cm, 18 mS/cm, 19 mS/cm, 20 mS/cm, 21 mS/cm, 22 mS/cm, 23 mS/cm, 24 mS/cm, 25 mS/cm, 26 mS/cm, 27 mS/cm, 28 mS/cm, 29 mS/cm, 30 mS/cm, 31 mS/cm, 32 mS/cm, 33 mS/cm, 34 mS/cm, 35 mS/cm, 36 mS/cm, 37 mS/cm, 38 mS/cm, 39 mS/cm, 40 mS/cm, o mayor.

En una realización, la porción delantera (es decir, la fracción recogida o combinada de interés) del eluato es de no más del 80% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 70% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 80% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 70% y el 75% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 75% y el 80% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 70%, el 71%, el 72%, el 73%, el 74%, el 75%, el 76%, el 77%, el 78%, el 79% o el 80% del eluato total.

En otra realización, la porción delantera (es decir, la fracción recogida o combinada de interés) del eluato es de no más del 70% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y el 70% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 70% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 60% y 65% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 65% y el 70% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es del 60%, el 61%, el 62%, el 63%, el 64%, el 65%, el 66%, el 67%, el 68%, el 69% o el 70% del eluato total.

En otra realización, la porción delantera (es decir, la fracción recogida o combinada de interés) del eluato es de no más del 60% del eluato total. En una realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 60% del eluato total. En otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 50% y el 55% del eluato total. En aún otra realización específica, la porción delantera del eluato es de entre el 55% y el 60% del eluato total. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato es de 50%, el 51%, el 52%, el 53%, el 54%, el 55%, el 56%, el 57%, el 58%, el 59% o el 60% del eluato total.

En otra realización, las porciones delantera y trasera del eluato están definidas por el pH de la disolución. En una realización, la porción delantera es el eluato que tiene un pH de no más de 7,0. En otra realización, la porción delantera es el eluato que tiene un pH de no más de 6,5. En otra realización, la porción delantera es el eluato que tiene un pH de no más de 6,0. En otra realización, la porción delantera es el eluato que tiene un pH de no más de 5,5. En otra realización, la porción delantera es el eluato que tiene un pH de no más de 5,0. En aún otras realizaciones, la porción delantera es el eluato que tiene un pH de no más de 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, o menos.

En una realización, la porción delantera del eluato se define como la fracción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico antes del momento en el que la DO_{280} del eluato cae por debajo de 2,0 UA. En otra realización, la porción delantera del eluato se define como la fracción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico antes del momento en el que la DO_{280} del eluato cae por debajo de 1,5 UA. En otra realización, la porción delantera del eluato se define como la fracción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico antes del momento en el que la DO_{280} del eluato cae por debajo de 1,0 UA. En otra realización, la porción delantera del eluato se define como la fracción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico antes del momento en el que la DO_{280} del eluato cae por debajo de 0,5 UA. En aún otras realizaciones, la porción delantera del eluato se define como la fracción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico antes del momento en el que la DO_{280} del eluato cae por debajo de 2,0 UA, 1,9 UA, 1,8 UA, 1,7 UA, 1,6 UA, 1,5 UA, 1,4 UA, 1,3 UA, 1,2 UA, 1,1 UA, 1,0 UA, 0,9 UA, 0,8 UA, 0,7 UA, 0,6 UA, 0,5 UA, 0,4 UA, 0,3 UA, 0,2 UA, 0,1 UA, o menos. En determinadas realizaciones, la porción delantera del eluato se define además como la porción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico después de que la DO_{280} del eluato se eleva por encima de un umbral, por ejemplo, 0,1 UA, 0,2 UA, 0,3 UA, 0,4 UA, 0,5 UA, 0,6 UA, 0,7 UA, 0,8 UA, 0,9 UA, 1,0 UA, 1,1 UA, 1,2 UA, 1,3 UA, 1,4 UA, 1,5 UA, 1,6 UA, 1,7 UA, 1,8 UA, 1,9 UA, 2,0 UA, o más.

E. Ultrafiltración/Diafiltración (UF/DF)

Las composiciones de IgG pueden concentrarse adicionalmente mediante ultrafiltración/diafiltración. En una realización, la composición de IgG puede concentrarse mediante ultrafiltración hasta una concentración de proteína de entre el 2% y el 10% (p/v). En determinadas realizaciones, la ultrafiltración se lleva a cabo en un casete con una pantalla de canal abierto y la membrana de ultrafiltración tiene un punto de corte de peso molecular nominal

(NMWCO) de no más de 100 kDa o no más de 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, o menos kDa. En una realización preferida, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO de no más de 50 kDa.

5 Tal como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0330071, puede usarse una membrana de canal abierto con una formulación y lavado posterior específicamente diseñados cerca del fin del procedimiento de producción para hacer que las composiciones de IgG resultantes tengan el doble de concentración de proteína (200 mg/ml) en comparación con IG i.v. del estado de la técnica (por ejemplo, GAMMAGARD® LIQUID) sin afectar al rendimiento ni a la estabilidad de almacenamiento. Con la mayoría de las membranas de ultrafiltración disponibles comercialmente no puede lograrse una concentración de IgG 200 mg/ml sin importantes pérdidas de proteína. Estas membranas se bloquearán pronto y, por tanto, es difícil lograr un lavado posterior adecuado. Por tanto, han de usarse configuraciones de membrana de canal abierto. Incluso con membranas de canal abierto, ha de usarse un procedimiento de lavado posterior específicamente diseñado para obtener la concentración requerida sin pérdida de proteína significativa (pérdida de menos del 2%). Incluso más sorprendente es el hecho de que la concentración de proteína mayor de 200 mg/ml no afecta a la capacidad de inactivación de virus de la etapa de almacenamiento de pH bajo.

Tras la finalización de la etapa de ultrafiltración, el concentrado puede concentrarse adicionalmente mediante diafiltración frente a una disolución adecuada para administración intravenosa o intramuscular. En determinadas realizaciones, la disolución de diafiltración puede comprender un agente estabilizante y/o tamponante. En una realización preferida, el agente estabilizante y tamponante es glicina a una concentración adecuada, por ejemplo desde 0,20 M hasta 0,30 M, o desde 0,22 M hasta 0,28 M, o desde 0,24 M hasta 0,26 mM, o a una concentración de 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 ó 3,0. En una realización preferida, el tampón de diafiltración contiene glicina 0,25 M.

Normalmente, el volumen de intercambio mínimo es al menos aproximadamente 3 veces el volumen del concentrado original o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más veces el volumen del concentrado original. La disolución de IgG puede concentrarse hasta obtener una concentración de proteína final de entre el 3% y el 25% (p/v), o entre el 3% y el 7%, o entre el 6% y el 18% (p/v), o entre el 7% y el 16% (p/v), o entre el 8% y el 14% (p/v), o entre el 9% y el 12%, o hasta una concentración final del 5%, o el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 21%, el 22%, el 23%, el 24%, el 25% o mayor. En una realización, se logra una concentración de proteína final de al menos el 23% sin añadir la fracción de lavado posterior a la disolución concentrada. En otra realización, se logra una concentración de proteína final de al menos el 24% sin añadir la fracción de lavado posterior a la disolución concentrada. En aún otra realización, se logra una concentración de proteína final de al menos el 25% sin añadir la fracción de lavado posterior a la disolución concentrada. Normalmente, al final del procedimiento de concentración, el pH de la disolución será desde aproximadamente 4,6 hasta 5,1.

En una realización a modo de ejemplo, se ajusta el pH de la composición de IgG hasta $5,2 \pm 0,2$ usando ácido clorhídrico 1 M y se concentra hasta el $5 \pm 1\%$ en g de proteína mediante ultrafiltración (100 kDa o límite de corte de peso molecular nominal menor). Entonces el concentrado se filtra mediante diafiltración con disolución de diafiltración (NaCl 0,02 M, PEG al 0,05% (p/v)). El filtrado obtenido mediante diafiltración se enfría hasta $5 \pm 2^\circ\text{C}$. Se ajusta la concentración del tampón Tris de la disolución hasta 0,025 M usando Tris 2,0 M y se reajusta el pH hasta $7,8 \pm 0,2$.

45 F. Cromatografía de intercambio aniónico

En una realización, se carga entonces la proteína en una columna de flujo rápido de ANX Sepharose® 4 equilibrada para retirar contaminantes derivados de plasma. Tras finalizar la carga, se lava la columna con tampón de equilibrado (Tris 25 mM, NaCl 20 mM, pH $7,8 \pm 0,2$). Se combina lo que pasa a través de la columna (disolución de IgG) de las etapas de carga y lavado.

G. Inactivación y/o retirada de virus

En determinadas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para la preparación de una composición de inmunoglobulinas enriquecida incluirán además al menos una, preferiblemente al menos dos, lo más preferiblemente al menos tres, etapas de inactivación o retirada de virus. Los ejemplos no limitativos de etapas de inactivación o retirada de virus que pueden emplearse con los métodos proporcionados en el presente documento incluyen, tratamiento con disolvente y detergente (Horowitz *et al.*, Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Supl 3): S21-S28 y Kreil *et al.*, Transfusion 2003 (43):1023-1028), nanofiltración (Hamamoto *et al.*, Vox Sang 1989 (56)230-236 y Yuasa *et al.*, J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024), e incubación a pH bajo a altas temperaturas (Kempf *et al.*, Transfusion 1991 (31)423-427 y Louie *et al.*, Biologicals 1994 (22): 13-19).

Pueden realizarse etapas de inactivación o retirada de virus en cualquier fracción de inmunoglobulina intermedia generada durante el procedimiento de fabricación. Por ejemplo, en una realización, puede realizarse una etapa de inactivación o retirada de virus en una suspensión de la fracción I+II+III, suspensión de la fracción A, filtrado de la

fracción B, suspensión de la fracción II, eluato de intercambio catiónico, eluato de intercambio aniónico, y similares.

En una realización, se realiza una etapa de inactivación o retirada de virus en una suspensión de la fracción II. En una realización preferida, la suspensión de la fracción II se somete a tratamiento con disolvente y detergente (D/D).

1. Tratamiento con disolvente y detergente (D/D)

Con el fin de inactivar diversos contaminantes víricos que pueden estar presentes en productos derivados de plasma, uno o más productos intermedios de la fabricación de inmunoglobulinas pueden someterse a un tratamiento con disolvente y detergente (D/D). En una realización preferida, un precipitado de la fracción II se resuspende y se trata con D/D. Se conocen bien en la técnica métodos para el tratamiento con detergente de fracciones derivadas de plasma (para revisión véase, Pelletier JP *et al.*, Best Pract Res Clin Haematol. 2006; 19(1):205-42). Generalmente, puede usarse cualquier tratamiento con D/D convencional junto con los métodos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, a continuación se proporciona un protocolo a modo de ejemplo para un tratamiento con D/D.

Brevemente, se añaden Triton X-100, Tween-20 y tri(n-butil)fosfato (TNBP) al filtrado de PptG clarificado a concentraciones finales de aproximadamente el 1,0%, el 0,3% y el 0,3%, respectivamente. Entonces se agita la mezcla a una temperatura de entre aproximadamente 18°C y aproximadamente 25°C durante al menos aproximadamente una hora.

En una realización, se añaden los reactivos de D/D (por ejemplo, Triton X-100, Tween-20 y TNBP) mediante pulverización en vez de adición de fluido. En otras realizaciones, los reactivos de detergente pueden añadirse como sólidos a la disolución intermedia de inmunoglobulina, que se mezcla para garantizar una rápida distribución de los componentes de D/D. En determinadas realizaciones, es preferible añadir reactivos sólidos rociando los sólidos sobre una superficie deslocalizada del filtrado de manera que no se produzca sobreconcentración local, tal como en la adición de fluido. En otra realización, se realiza una mejora del procedimiento bombeando una disolución que contiene inmunoglobulina a un tanque en el que los reactivos de DD ya están presentes o bien en forma concentrada o bien diluida.

2. Nanofiltración

Con el fin de reducir adicionalmente la carga vírica de la composición de inmunoglobulinas proporcionada en el presente documento, puede someterse a nanofiltración una fracción intermedia de inmunoglobulina usando un dispositivo de nanofiltración adecuado. En determinadas realizaciones, el dispositivo de nanofiltración tendrá un tamaño de poro medio de o aproximadamente entre 15 nm y 200 nm. Los ejemplos de nanofiltros adecuados para este uso incluyen, sin limitación, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N y 75N (Planova). En una realización específica, el nanofiltro puede tener un tamaño de poro medio de o aproximadamente entre 15 nm y 72 nm, o de o aproximadamente entre 19 nm y 35 nm, o de o aproximadamente 15 nm, 19 nm, 35 nm o 72 nm. En una realización preferida, el nanofiltro tendrá un tamaño de poro medio de o aproximadamente 35 nm, tal como un filtro PLANOVA 35N de Asahi o equivalente del mismo.

Opcionalmente, puede realizarse ultrafiltración/diafiltración para concentrar adicionalmente el nanofiltrado. En una realización, se usa una membrana de canal abierto con una formulación y lavado posterior específicamente diseñados cerca del final del procedimiento de producción dando como resultado una composición de inmunoglobulinas de alta concentración.

Posteriormente a la nanofiltración, el filtrado puede concentrarse adicionalmente mediante ultrafiltración y/o ajustarse la composición de tampón mediante diafiltración. En una realización, el nanofiltrado puede concentrarse mediante ultrafiltración hasta obtener una concentración de proteínas de o aproximadamente entre el 0,5% y el 10% (p/v). En determinadas realizaciones, la ultrafiltración se lleva a cabo en un casete con una pantalla de canal abierto y la membrana de ultrafiltración tiene un punto de corte de peso molecular nominal (NMWCO) de menos de o aproximadamente 150 kDa o menos de o aproximadamente 140, 130, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, o menos kDa. En una realización, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO de no más de 50 kDa.

3. Incubación a pH bajo

En determinadas realizaciones, puede tratarse una disolución que contiene inmunoglobulina para reducir o inactivar la carga vírica de la composición. En una realización, esto se logra ajustando el pH de la composición a un pH bajo, por ejemplo, menos de o aproximadamente 6,0, e incubando durante al menos aproximadamente una semana antes de liberar la composición. En una realización preferida, el pH de la disolución en volumen se ajusta a menos de o aproximadamente 5,5 antes de la incubación. En una más realización preferida, el pH de la disolución se reduce hasta menos de o aproximadamente 5,0 antes de la incubación. En determinadas realizaciones, el pH de la disolución se reduce hasta menos de o aproximadamente 6,0 o menos de o aproximadamente 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, o menor antes de la incubación.

En determinadas realizaciones, se incuba entonces la disolución durante al menos una semana, o al menos 2, 3, 4, o más semanas, o durante al menos 1, 2, 3, o más meses. En realizaciones preferidas, la composición se incuba a una temperatura por encima de 20°C, o por encima de 25°C o por encima de 30°C. En realizaciones particulares, la composición se incuba a una temperatura de 20°C, o 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, o mayor.

4. Liofilización y tratamiento térmico

En aún otras realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de inmunoglobulinas liofilizadas, sometidas a liofilización según métodos conocidos en la técnica. La actividad vírica de estas composiciones liofilizadas, que puede haberse sometido previamente a otras etapas de inactivación o retirada de virus tales como tratamiento con D/D o nanofiltración, puede reducirse adicionalmente mediante tratamiento térmico de la composición liofilizada. Se conocen bien en la técnica tratamientos térmicos para la inactivación de cargas víricas en factores sanguíneos (por ejemplo, véase, Piszkiwicz *et al.*, *Thromb Res.* 1987 Jul 15; 47(2):235-41; Piszkiwicz *et al.*, *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1989;(56):44-54; Epstein y Fricke, *Arch Pathol Lab Med.* 1990 Mar; 114(3):335-40).

H. Formulación

Tras la finalización de la etapa de diafiltración, la concentración de proteína de la disolución se ajusta con el tampón de diafiltración hasta una concentración final de entre aproximadamente el 3% y aproximadamente el 20% (p/v), o entre el 3% y el 7%, o entre aproximadamente el 6% y aproximadamente el 18% (p/v), o entre aproximadamente el 7% y aproximadamente el 16% (p/v), o entre aproximadamente el 8% y aproximadamente el 14% (p/v), o entre aproximadamente el 9% y aproximadamente el 12%, o hasta una concentración final de aproximadamente el 5%, o el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 21%, el 22%, el 23%, el 24%, el 25%, o mayor. En una realización preferida, la concentración de proteína final de la disolución es de entre aproximadamente el 9% y aproximadamente el 11%, más preferiblemente de aproximadamente el 10%.

La disolución a granel formulada se esteriliza adicionalmente mediante filtración a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro absoluto de no más de aproximadamente 0,22 micrómetros, por ejemplo, aproximadamente 0,2 micrómetros. Entonces, la disolución se dispensa de manera aséptica en recipientes finales para un sellado adecuado, con muestras tomadas para pruebas.

En una realización, la composición de IgG se ajusta adicionalmente hasta una concentración de aproximadamente el $10,2 \pm 0,2\%$ (p/v) con tampón de diafiltración. El pH se ajusta a de aproximadamente 4,4 a aproximadamente 4,9 si es necesario. Finalmente, la disolución se filtra en condiciones estériles y se incuba durante tres semanas a o aproximadamente 30°C.

En una realización a modo de ejemplo, la disolución de IgG resultante se estabiliza con NaCl (máximo 0,15 M), glicina (máximo 0,3 M), glucosa (máximo 0,11 M) y albúmina humana (máximo 3 mg/ml). El pH se ajusta a $7,0 \pm 0,2$ usando ácido clorhídrico 1 M. Entonces se concentra la disolución mediante ultrafiltración hasta la concentración deseada y se reajusta el pH hasta $7,15 \pm 0,1$ usando ácido clorhídrico 1 M o hidróxido de sodio 1 M. La disolución en volumen se filtra en condiciones estériles usando un filtro de tamaño de poro de 0,2 micrómetros o equivalente.

La disolución de IgG estéril puede dispensarse de manera aséptica en un recipiente, colocarse un tapón para liofilización, congelarse, liofilizarse, sellarse en condiciones asépticas y taparse.

VIII. Ejemplos

Entre otras ventajas, los ejemplos 1 a 7 demuestran que: (1) la etapa elución de inmunoglobulinas de una resina de intercambio catiónico (por ejemplo, CM-Sefarosa) da como resultado una distribución bimodal de proteínas, donde la actividad amidolítica (PL-1) se eluye más tarde que IgG, haciendo posible retirar la actividad amidolítica con una pérdida mínima de rendimiento de IgG; (2) la elución de la actividad amidolítica (PL-1) de la resina de intercambio catiónico (por ejemplo, CM-Sefarosa) se correlaciona con, y está producida probablemente por, un cambio de pH en la columna de CM durante la elución según los métodos proporcionados en el presente documento; (3) la cantidad de proteína cargada en una resina de intercambio catiónico (por ejemplo, CM-Sefarosa) no influye en la retirada de la actividad amidolítica (PL-1) a lo largo de al menos un intervalo de 60 a 120 mg de proteína por ml de resina; (4) la monitorización del pH en la salida de la columna y la detención de la elución cuando se manifiesta el aumento conduce a una retirada parcial de la actividad amidolítica (PL-1), debido probablemente a que ya se ha alterado el equilibrio de pH en la parte superior de la columna; (5) la actividad amidolítica puede reducirse significativamente con una pérdida mínima en el rendimiento de IgG ($\leq 10\%$) recogiendo una combinación de elución inicial de menos de 3 VC, como tal, la monitorización del volumen de una etapa de elución de CM-Sefarosa es un método sencillo para reducir significativamente la actividad amidolítica de una composición de inmunoglobulinas preparada según los métodos proporcionados en el presente documento; y (6) recogiendo el "primer pico" de una etapa de elución de CM-Sefarosa, puede lograrse una composición que tiene una concentración de agregado de IgG menor; actividad de

PKA menor, actividad de PL-1 menor, una concentración de monómero de IgG mayor y una distribución de subclase de IgG más deseable.

5 Además, los ejemplos 8 y 9 demuestran al menos que (1) las proteínas que producen TGA elevado y FXIa pueden separarse en cromatografía en CM dividiendo la última parte de 25% del eluato; (2) las ventajas descritas anteriormente pueden repetirse en procedimientos de fabricación a gran escala; y (3) los eluatos del intercambio catiónico (es decir, CM-Sefarosa) producidos en procedimientos de fabricación a gran escala pueden combinarse monitorizando la DO, por ejemplo, el eluato puede recogerse en una primera combinación hasta que la DO del eluato desciende por debajo de 2,0, proporcionando separación significativa de proteínas no deseadas que producen valores elevados de FXIa y TGA.

Ejemplo 1

15 Este ejemplo describe la distribución de proteínas no deseadas que producen valores elevados de TGA, FXIa y disminuidos de NAPTT de una composición de inmunoglobulinas de la fracción II preparada según un fraccionamiento con alcohol de Kistler-Nitschmann modificado. Estas impurezas pueden separarse durante la elución de una etapa de cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, cromatografía de flujo rápido en CM-Sefarosa).

20 Este ejemplo demuestra una reducción significativa en el contenido amidolítico (por ejemplo, FXI y/o FXIa) durante la elución de la cromatografía de intercambio catiónico. El método da como resultado un producto de inmunoglobulina final que contiene significativamente menos actividad de TGA y FXIa. Esta reducción se logra mediante un fraccionamiento específico de la etapa de eluato de CM, que separa eficazmente la actividad amidolítica (presente en la porción trasera del eluato) de la fracción de IgG principal (encontrada en la porción delantera del eluato). Este ejemplo muestra que dividiendo el eluato de intercambio catiónico en las porciones delanteras y traseras, se separan proteínas traza no deseadas del volumen del contenido en IgG. Además, este ejemplo demuestra que este procedimiento es eficaz y económicamente factible para la fabricación a gran escala.

30 Brevemente, se preparó el precipitado de la fracción II tal como sigue. Tras la crioprecipitación de plasma humano combinado, se formó un precipitado de la fracción I+II+III mediante precipitación con alcohol al 20% a pH 6,9. Tras la resuspensión del precipitado I+II+III, se añadió alcohol hasta una concentración final del 20% a pH de 7,2, para formar el precipitado A. La separación del precipitado A se realizó mediante centrifugación. La fracción I+III (también denominada precipitado de suspensión B) se forma mediante la precipitación de un precipitado A suspendido con alcohol al 17%. El precipitado se recupera mediante filtración o centrifugación. Entonces se procesa el filtrado de suspensión B para formar la fracción II, que contiene la fracción de proteína plasmática de gammaglobulina parcialmente purificada (por ejemplo, IgG).

40 Entonces se trató una suspensión de la fracción II clarificada con una mezcla de detergente disolvente (DD) y se cargó sobre una columna de ff de CM-Sefarosa. Tras el lavado de los reactivos con DD residual, se eluye la fracción de IgG unida a la resina. Posteriormente, se somete la disolución de inmunoglobulina a ultra/diafiltración y entonces se carga en un intercambiador aniónico para retirar las impurezas trazas. Tras otra etapa de concentración, la formulación final puede seguirse por liofilización.

45 Entonces se disolvió el precipitado de la fracción II en agua fría a 4°C y pH 5,2 ± 0,2. Tras la clarificación mediante filtración en CWSS, se ajustó la disolución para el tratamiento con DD. Se ajustó la concentración de proteína al 2% y se mantuvo la temperatura durante la incubación con DD en el intervalo de 20°C a 25°C. Entonces se cargó la disolución de proteína en una columna de flujo rápido de CM-Sefarosa equilibrada (tampón de equilibrado: acetato de sodio 0,025 M, pH 5,0 ± 0,2). Tras la carga, se lavó la columna con 30 volúmenes de columna de tampón acetato (acetato de sodio 0,01 M, pH 5,5 ± 0,2), para lavar los reactivos de DD, antes de que la proteína adsorbida se eluyera con tampón de elución (NaCl 0,25 M, glicina 0,2 M, PEG 3350 al 0,1%, Tris 25 mM, pH 8,00). La recogida de la primera parte del eluato (E1) comenzó a DO de 400 mUA y se detuvo tras exactamente 2,7 volúmenes de columna (figura 1). Se recogió la segunda fracción (E2) del pico de elución hasta que la DO cayó hasta 400 mUA de nuevo. Entonces se procesaron las fracciones eluidas por separado durante el resto del procedimiento.

55 Entonces se ajustaron las composiciones de E1 y E2 a pH 5,2 y se sometieron a ultra/diafiltración frente a tampón de diafiltración (NaCl 0,02 M, PEG 3350 al 0,05%) para concentrar hasta proteínas al 5% (p/v). Se añadió Tris 0,025 M a las composiciones y se ajustó el pH a 7,7. Entonces se cargaron las fracciones de IgG en una columna de flujo rápido de ANX-Sefarosa equilibrada con tampón (Tris 0,025 M, NaCl 0,02 M, pH 7,7). Se recogió la fracción no retenida de ANX resultante y se complementó con NaCl 8,5 g/l, glicina 16,5 g/l, anhídrido de glucosa 21,7 g/l y albúmina 1 g/l (20%). Entonces se ajustó el pH y se concentraron las composiciones de E1 y E2 hasta proteína al 10% (p/v) mediante ultrafiltración. Tras la concentración, se complementaron de nuevo las disoluciones concentradas con NaCl y glicina (pero no con albúmina) y se ajustó el pH a 7,1, si fue necesario, antes de la filtración en condiciones estériles.

65 En la figura 1 se proporciona un resultado de cromatógrafo que muestra la absorbancia (mUA), la conductividad y el pH de la etapa de cromatografía. Tal como puede observarse, una elución de una sola etapa con el tampón de

elución descrito anteriormente da como resultado una elución de dos picos. De manera notable, tras la adición del tampón de elución, el pH del eluato cae significativamente a medida que el primer pico sale de la columna, y luego se eleva considerablemente con la elución del segundo pico. Tal como se describe, los picos de elución se separaron recogiendo 2,7 volúmenes de columna en una primera fracción E1 (a la izquierda de la línea vertical mostrada en la figura 1) y una segunda fracción (a la derecha de la línea vertical mostrada en la figura 1).

Las fracciones eluidas (E1 y E2) se procesaron por separado para producir una preparación de inmunoglobulina final, tal como se describe a continuación. Para hacer esto, se ajustó el pH de las fracciones E1 y E2 a 5,2 y se sometieron las muestras a diafiltración frente a tampón de diafiltración (NaCl 0,02 M, PEG 3350 al 0,05%) para concentrar la composición hasta una concentración de proteína final del 5%. Tras la diafiltración, se añadió Tris 0,025 M a cada disolución de proteína y se ajustó el pH a 7,7. Entonces se cargaron las fracciones de IgG en una columna de flujo rápido de ANX-Sefarosa equilibrada (tampón de equilibrado Tris 0,025 M, NaCl 0,02 M pH 7,7) y se recogió la fracción no retenida. Entonces se complementó la fracción no retenida de ANX con NaCl 8,5 g/l, glicina 16,5 g/l, anhídrido de glucosa 21,7 g/l y albúmina 1 g/l (20%). Entonces se ajustó el pH de la disolución a 7,00 y se concentró la muestra de inmunoglobulina hasta proteína al 10% mediante ultrafiltración. Tras la concentración, se añadieron de nuevo NaCl, glicina y anhídrido de glucosa y se ajustó el pH a 7,1, si fue necesario, antes de la filtración en condiciones estériles.

Para caracterizar la etapa cromatográfica, se determinó un balance de masas, cuyos resultados se muestran en la tabla 1. Aproximadamente el 10% de la proteína total se encontró en la segunda parte del pico de elución. Esta es la pérdida de rendimiento que se produce cuando se detiene la composición combinada tras 2,7 volúmenes de columna de eluato.

Tabla 1. Balance de masas de la etapa de enriquecimiento cromatográfico en CM.

	TPUV (%)	Proteína (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento (g/l de plasma)
Dis. de la fracción II	6,99	150,07	100,00	3,93
CWSS	6,33	149,74	99,78	3,92
E1 de CM	2,97	136,27	90,80	3,57
E2 de CM	1,04	16,40	10,93	0,43
E1 ANX D/N	2,56	92,96	61,94	2,43
E1 ANX 2M	0,87	11,25	7,50	0,29
FC de E1	4,76	76,31	60,85	2,00
E2 ANX D/N	2,71	12,56	8,37	0,33
E2 ANX 2M	0,78	1,02	0,68	0,03
FC de E2	4,77	8,21	5,47	0,21

Entonces se analizaron los recipientes finales preparados a partir de las dos fracciones de elución de CM para determinar la distribución de tamaño molecular, la actividad anti-complementaria, la actividad amidolítica usando tanto PL-1 y TGA como sustratos, la actividad de FXIa y la actividad de NAPTT. Los resultados se muestran en la tabla 2 y la tabla 3. La caracterización bioquímica de los recipientes finales derivados de las partes primera y segunda de la fracción de IgG eluida reveló que la primera parte de la elución está esencialmente libre de FXIa y otras proteínas no deseables que producen niveles elevados de TGA y disminuidos de NAPTT. En cambio, las actividades de FXIa y amidolítica están enriquecidas en la segunda parte, donde el contenido en agregados y oligodímeros también es mayor. Resulta interesante que el valor de AAC en la primera parte del eluato es muy bajo, mientras que la segunda parte del eluato muestra un valor mucho mayor.

Tabla 2. Comparación de la distribución de tamaño molecular de los dos E1 y E2 de recipientes finales.

HPLC	Polímeros	Oligo/Dímeros	Monómeros	Fragmentos
FC de E1	0,20%	4,66%	93,13%	2,01%
FC de E2	2,82%	9,09%	85,95%	2,15%

Tabla 3. Comparación de la caracterización bioquímica de los dos E1 y E2 de recipientes finales.

	PKKA	TGA	FXIa	AAC	PL-1	NAPTT
	PKKA/ml	% de plasma normal	ml/ml de FXIa	% de CM50 consumido	nmol/mil.min	(Plasma con FXI)
FC de E1	< 4	96,87	< 0,04	18,9/36,6%	< 10	> 5 mg
FC de E2	6,9	258,41	2,14	48,2/58,7%	< 10	> 5 mg

En conclusión, la división de la elución de la columna de ff de CM-Sefarosa da como resultado dos fracciones y permite la fabricación de composiciones de IgG sustancialmente libres de FXIa.

Ejemplo 2

Con el fin de reducir la cantidad de actividad amidolítica presente en las preparaciones de inmunoglobulina a escala de fabricación, se investigaron las condiciones usadas para eluir y fraccionar la cromatografía de intercambio catiónico. A continuación se proporcionan los detalles de estas investigaciones.

Se realizaron una serie de experimentos para encontrar las disoluciones adecuadas para reducir/retirar la actividad amidolítica durante el procedimiento posterior según el método de producción de S/D de Gammagard descrito en el presente documento. Brevemente, se disolvió pasta de fracción de Cohn en agua fría a 4°C y pH 5,2±0,2. Tras la clarificación mediante filtración en CWSS las muestras o bien se filtraron en condiciones estériles y se almacenaron a 4°C o bien se diluyeron con agua hasta obtener una concentración de proteínas del 2% para su procesamiento inmediato. Entonces se llevó la disolución hasta 20-25°C y se incubó durante 1 hora con una mezcla de disolvente/detergente (Triton X-100 al 1%, Tween 80 al 0,3%; TNBP al 0,3%) antes de cargar la disolución de proteína en una columna de flujo rápido de CM-Sefarosa equilibrada (tampón de equilibrio: acetato de Na 25 mM, pH 5,0±0,2). Tras la carga, se lavó la columna con tampón acetato (acetato de Na 0,01 M, pH 5,5±0,2) y se eluyó la IgG adsorbida con tampón de elución (NaCl 0,25 M, glicina 0,2 M, PEG 3350 al 0,1%, Tris 25 mM, pH 7,8). Durante las series de ff en CM-Sefarosa, se monitorizaron los siguientes parámetros para fraccionar el eluato de CM (en un punto definido): DO 280; pH; y volumen de elución en volúmenes de columna (VC). Los eluatos o bien se sometieron entonces a ultra/diafiltración con tampón de diafiltración (NaCl 0,02 M, PEG 3350 al 0,05%) o bien se usaron inmediatamente para el análisis. Esta etapa de concentración se realizó con el fin de medir la actividad amidolítica a valores de proteína que también correspondían a una composición de recipiente final del 10%.

Durante la elución, el eluato logró rápidamente el valor de conductividad del tampón de elución de CM. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 2, el pH del eluato medido en la salida de la columna cayó inicialmente desde 5,5, cuando estaba en el tampón de lavado, hasta por debajo de 5,0 (4,3 - 4,8) y permaneció sin cambios durante los primeros 4 VC, a pesar del hecho de que el tampón de elución tenía un pH de 7,8. Se observó un aumento en el pH hasta aproximadamente 7,8 al final de la recogida del eluato. La monitorización de la DO 280 en la salida de la columna muestra que este cambio de pH corresponde a la liberación de un segundo pico, donde se detecta la mayor parte de la actividad amidolítica (tal como se mide a través del ensayo de PL-1).

Ejemplo 3

Para investigar adicionalmente el fenómeno de elución bimodal en CM-Sefarosa y el cambio de pH observado en el ejemplo 1 y el ejemplo 2, se recogieron fracciones de elución individuales durante otro experimento de cromatografía de flujo rápido en CM-Sefarosa. Brevemente, se realizó cromatografía de flujo rápido en CM-Sefarosa tal como se describió anteriormente, recogiendo y analizándose las fracciones por separado antes de combinar las fracciones A - N y concentrarlas mediante ultrafiltración. El material de partida para la etapa cromatográfica fue pasta de fracción II de Cohn (P25001ivLE; adsorbida con AT-III y FIX). Se equilibró la columna de CM-Sefarosa con tampón que tenía un pH de 5,2 y el lavado se realizó a un pH de 5,7. La velocidad de flujo de la etapa cromatográfica se mantuvo a 0,64 cm/min.

Tras el cambio de pH, se encontró una cantidad creciente de actividad amidolítica (PL-1) en las fracciones. Incluso en la combinación concentrada se observa una reducción de la actividad amidolítica. El hecho de que la actividad de PL1 fuera detectable tras ultra/diafiltración o bien se debe a dilución en el eluato de CM o bien a la generación del mismo durante la concentración.

Tal como se muestra en la tabla 4, las fracciones que eluyeron con un pH por debajo de 5,5 (fracción A-N) contenían concentraciones mucho menores de actividad amidolítica en comparación con las que eluyeron con valores de pH mayores (fracciones O y P). La cuantificación de la actividad amidolítica muestra que se eluyó más actividad en las fracciones O y P que en todas las fracciones A-N combinadas. Tras el cambio de pH, se encontró una cantidad creciente de actividad amidolítica (PL-1) en las fracciones. Incluso en la combinación concentrada se observa una reducción de la actividad amidolítica. El hecho de que la actividad de PL1 fuera detectable tras ultra/diafiltración o bien se debe a dilución en el eluato de CM o bien a la generación del mismo durante la concentración.

Tabla 4: Análisis de fracciones de elución de ff de CM-Sefarosa

Muestra	Eluato en volumen de columna VC	pH	Volumen (corregido) g	Conc. de proteína %	Proteína (corregida) g	Recuperación de etapa proteica %	Actividad amidolítica (PL-1) nmol/mil.min	Actividad amidolítica (PL-1) nmol/min por g de proteína
Resusp. de pasta			1349	5,4	73,00	100,0	14,5	268

Filtrado en CWSS			1480	4,7	66,97	94,5	14,4	309
Fracción A	0,26	5,6	245	0,04	0,10	0,1	< 10	
Fracción B	0,26	4,8	247	2,17	5,36	7,3	< 10	
Fracción C	0,27	4,6	255	6,59	17,09	23,4	< 10	
Fracción D	0,27	4,8	256	5,55	14,22	19,5	< 10	
Fracción E	0,27	4,5	256	4,21	10,78	14,8	< 10	
Fracción F	0,28	4,7	270	2,99	8,08	11,1	< 10	
Fracción G	0,28	4,8	252	2,15	5,41	7,4	< 10	
Fracción H	0,26	4,7	245	1,49	3,65	5,0	< 10	
Fracción I	0,29	4,7	278	0,99	2,75	3,8	< 10	
Fracción J	0,30	4,7	287	0,67	1,92	2,5	< 10	
Fracción K	0,27	4,7	256	0,51	1,32	1,8	< 10	
Fracción L	0,26	4,7	251	0,43	1,08	1,5	< 10	
Fracción M	0,27	4,7	257	0,37	0,95	1,3	< 10	
Fracción N	0,28	4,9	267	0,39	1,04	1,4	< 10	
Fracción O	0,34	5,5	324	0,52	1,69	2,3	28,2	5423
Fracción P	0,29	7,5	276	0,34	0,94	1,3	29,6	3705
Fracción Q	0,28	7,8	270	0,01	0,03	0,0	< 10	
Eluato de CM A-N			3616	1,91	69,08	94,6	< 10	
A-N tras UF/DF			996	7,00	69,70	95,5	12,7	181

Ejemplo 4

- 5 Para definir adicionalmente los límites de elución de la actividad amidolítica de la resina de ff de CM-Sefarosa, se realizó otro experimento, tal como se describió anteriormente, excepto en que los eluatos de CM se recogieron en fracciones definidas por un límite de pH. Específicamente, se recogieron eluatos de CM hasta un pH predefinido (4,3, 4,8, 6,0, 7,5), tal como se monitoriza en la salida de la columna. En este experimento, el material de partida para la etapa cromatográfica fue pasta de fracción II de Cohn (P25001ivLE; adsorbida con AT-III y FIX), como en el ejemplo 3. Se equilibró la columna de CM-Sefarosa a un pH de 4,8 y se lavó a un pH de 5,3. Se sometieron las fracciones de eluato a ultra/diafiltración y se ajustó el pH con Tris antes del análisis. En este experimento, el pH del eluato cayó hasta 4,1 al inicio de la etapa de elución. El análisis de las fracciones de eluato recogidas se muestra en la tabla 5.

15 Tabla 5. Análisis de fracciones de elución de ff de CM-Sefarosa

Muestra	Eluato en volumen de columna VC	Conc. de proteína %	Actividad amidolítica (PL-1) nmol/mol.min	Actividad amidolítica (PL-1) nmol/min por g de proteína
Resusp. de pasta		5,7	14,4	251
Filtrado en CWSS		4,9	14,1	287
Eluato de CM (pH 4,3)	4,88 (4,38)	2,29	< 10	
Tras UF/DF		7,42	12,0	162
Eluato de CM (pH 4,8)	4,49	2,66	< 10	
Tras UF/DF		6,57	12,7	193
Eluato de CM (pH 5,0)	5,21	2,11	< 10	
Tras UF/DF		7,20	14,1	195
Eluato de CM (pH 7,5)	6,43	1,71	< 10	
Tras UF/DF		6,71	15,8	235

Ejemplo 5

- 20 A continuación, se determinó si una reducción en la cantidad de proteína por resina de CM-Sefarosa unitaria potenciaría adicionalmente la separación de picos mostrada en la figura 2. Con el fin someter esto a prueba, se realizaron una serie de series de cromatografías de ff en CM-Sefarosa con cargas de proteína decrecientes, que oscilaban entre 118 mg de proteína por ml de resina hasta 57 mg/proteína por ml de resina. Como en el ejemplo 2, el material de partida para el experimento fue ruta II de pasta de fracción II de Cohn; P24701IV; que incluye la retirada de FIX, FVII y ATIII del plasma pobre en crioprecipitado mediante adsorción (Tabla 6). Se equilibró la resina a pH 5,2 y se realizó la etapa de lavado a pH 5,7. Se combinaron los eluatos de CM-Sefarosa como en el ejemplo 2, para dar una primera parte (el primer pico) y una segunda parte (el segundo pico). La figura 2 proporciona un resultado de cromatógrafo a modo de ejemplo, en el que la primera combinación termina y la segunda combinación

comienza cuando la absorbancia UV del eluato toca fondo a aproximadamente $DO_{280} = 1,6 \pm 0,2$ entre los dos picos.

Tabla 6. Análisis del material de partida (ruta II de pasta de fracción II de Cohn; P24701IV)

muestra	volumen (corregido) g	proteína (corregida) g	recuperación %	act. amidolítica (PL-1) nmol/mil.min	act. amidolítica (PL-1) nmol/min·g de proteína
Resusp. COHN II	1001	75	100	24,3	325
Filtrado en CWSS	1083	74	98	22,5	331
Filtrado en condiciones estériles	1067	72	96	22,5	335

Tal como se muestra en la tabla 7, la reducción de la carga de proteína de la resina no mostró ningún efecto sobre la separación de picos, pero tuvo un impacto sobre la recuperación. Concordando con los resultados presentados en los ejemplos anteriores, están presentes niveles muy bajos de actividad amidolítica en las primeras combinaciones de eluato de cada serie cromatográfica.

Tabla 7: Análisis de purificaciones cromatográficas en CM-Sefarosa realizadas con cargas de proteína variables.

mg de proteína/ml de medio	Muestra	Eluato en volumen de columna*	Concentración de proteína %	Recuperación %	Actividad amidolítica (PL-1) nmol/mol.min
116	Primera parte de eluato de CM	2,7	3,5	81,5	< 10
	Segunda parte de eluato de CM	4,8	0,3	13,5	
	Tras UF/DF		8,49		< 10
110	Primera parte de eluato de CM	2,3	4,0	78,1	< 10
	Segunda parte de eluato de CM	5,1	0,5	19,6	
	Tras UF/DF		7,16		< 10
80	Primera parte de eluato de CM	2,8	2,25	72,4	< 10
	Segunda parte de eluato de CM	3,5	0,6	24,7	
	Tras UF/DF		7,06		< 10
72	Primera parte de eluato de CM	2,7	2,05	76,7	< 10
	Segunda parte de eluato de CM	4,4	0,4	23,1	
	Tras UF/DF		5,62		< 10
57	Primera parte de eluato de CM	2,3	1,71	67,0	< 10
	Segunda parte de eluato de CM	4,6	0,4	27,9	
	Tras UF/DF		3,88		< 10

Ejemplo 6

Para validar adicionalmente los hallazgos experimentales descritos anteriormente, se realizaron purificaciones cromatográficas en CM-Sefarosa con velocidades de flujo y esquemas de combinación de elución variables. Brevemente, se procesó una pasta de fracción II de Cohn que contenía un alto contenido en actividad amidolítica (100 nmol/ml.min al 6% de proteína) tal como se describe en el presente documento hasta la fracción precedente a la cromatografía en ANX. Para todas las series en CM-Sefarosa, se recogió el eluato cuando la UV comenzó a aumentar y se detuvo o bien tras 3 VC o bien tras 4 VC.

Se realizaron tres purificaciones cromatográficas en CM-Sefarosa tal como sigue. Se concentraron las fracciones de eluato recogidas tal como se describe en el presente documento y luego se concentraron adicionalmente para evitar valores de PL-1 por debajo del límite de detección para el ensayo de PL-1.

Primera serie: se aclaró la resina de CM-Sefarosa y se equilibró a una velocidad de flujo de 1 cm/min. La velocidad de flujo de las etapas de carga de proteína, lavado y elución se mantuvo constante a 0,64 cm/min. Se recogieron 3 volúmenes de columna (3 VC) de eluato en la combinación principal.

Segunda serie: se aclaró la resina de CM-Sefarosa y se equilibró a una velocidad de flujo de 1,2 cm/min. La velocidad de flujo de la etapa de carga de proteína fue de 0,64 cm/min. La velocidad de flujo de la etapa de lavado fue de 0,64 cm/min para los primeros 1,2 volúmenes de columna (VC) y de 1,8 cm/min para los siguientes 28,8 VC. La etapa de elución se realizó a 0,64 cm/min. Se recogieron 3 volúmenes de columna (3 VC) de eluato en la combinación principal.

Tercera serie: se aclaró la resina de CM-Sefarosa y se equilibró a una velocidad de flujo de 1,2 cm/min. La velocidad de flujo de la etapa de carga de proteína fue de 0,64 cm/min. La velocidad de flujo de la etapa de lavado fue de 0,64 cm/min para los primeros 1,2 volúmenes de columna (VC) y de 1,8 cm/min para los siguientes 28,8 VC. La etapa de elución se realizó a 0,64 cm/min. Se recogieron 4 volúmenes de columna de eluato en la combinación principal.

Se concentró la combinación principal de cada serie cromatográfica en CM-Sefarosa y se analizó para determinar la actividad amidolítica (PL-1), la concentración de proteína total y el perfil de HPLC. Tal como se muestra en la tabla 8, aumentar la velocidad de flujo de la etapa de lavado dio como resultado cantidades inferiores de actividad amidolítica en la combinación principal (compárense la serie 1 y la serie 2). La recogida de 4 VC, en lugar de 3 VC, proporcionó un rendimiento de proteína total nominal (2,55 g/l plasma frente a 2,5 g/l plasma; compárense la serie 3 y la serie 2), sin embargo, se produjo más del doble de la cantidad total de actividad amidolítica presente en la composición final (384,7 nmol de PL-1/min·g de proteína frente a 188,5 nmol de PL-1 /min·g proteína). La combinación de 4 VC también aumentó el contenido en agregados de la composición de inmunoglobulinas final (el 0,52% frente al 0,12%; compárense la serie 3 y la serie 2). De manera notable, el contenido final en actividad amidolítica y agregados de la composición preparada mediante la serie 2 concuerda con el observado anteriormente (véanse la tabla 2, la tabla 4 y la tabla 5).

Tabla 8. Análisis de purificaciones cromatográficas en CM-Sefarosa realizadas con velocidades de flujo de lavado y volúmenes de recogida de eluato variables.

	Serie 1	Serie 2	Serie 3
Rendimiento de proteína, g/l de plasma	2,36	2,5	2,55
Valor de proteína, %	8,12	7,48	3,28
nmol de PL-1/mol.min	27,5	14,1	35,7
nmol de PL-1 /min·g proteína	338,7	188,5	384,7
HPLC	Agregados	0,18	0,12
	Oligo/Dímeros	5,84	5,74
	Monómeros	93,88	94,10
	Fragmentos	0,08	0,04

Ejemplo 7

Para demostrar que los resultados proporcionados anteriormente podían aumentarse a escala hasta escala de fabricación industrial, se procesaron 360 g de material de partida de fracción II de Cohn como en los experimentos anteriores. Se recogieron 2,9 VC de CM-Sefarosa en una primera combinación y el resto del eluato se recogió en una segunda combinación. Entonces se procesaron las combinaciones de eluato resultantes hasta una composición de recipiente final, tal como se describe en el presente documento, adecuada para su administración a un individuo. Este procesamiento adicional incluyó cromatografía en ANX, ultra-/diafiltración y liofilización a partir de la formulación final. Entonces se analizaron las características bioquímicas de cada preparación final y los resultados se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Comparación de la caracterización bioquímica de los dos E1 (primera parte de la elución; 2,9 VC) y E2 (segunda parte de la elución; > 2,9 VC) de recipientes finales.

	Eluato de CM tras procesamiento posterior	
	primera parte de elución	segunda parte de elución
Valor de proteína, %	4,90	3,95
IgG, g/l	48,3	36,3
IgA, g/l	0,006	0,0002
Subclases de IgG	IgG 1	71,9
	IgG 2	21,0
	IgG 3	4,6
	IgG 4	2,5
HPLC	Agregados	0,07

	Oligo-/Dímeros	4,59	10,76
	Monómeros	94,81	87,86
	Fragmentos	0,52	1,32
Electroforesis CA			
	Albúmina	1,2	2,3
	α/β globulina		0,2
	γ globulina	98,8	97,5
ACA (C'H 50)		25,4	26,5
PKA, UI/ML		< 0,6	41,2
nmol de PL-1/mil.min		19,7	728,6
nmol de PL-1/min·g de proteína		402,0	18446,6

5 Tal como se muestra en la tabla 9, la composición final derivada de la primera parte de la elución de CM-Sefarosa contenía una actividad amidolítica 50 veces menor que la composición final derivada de la segunda parte de la elución de CM-Sefarosa (402 nmol de PL-1/min·g de proteína frente a 18.446,6 nmol de PL-1/min·g de proteína). La composición final derivada de la primera parte de la elución de CM-Sefarosa también contenía menos albúmina (el 1,2% frente al 2,3%), α/β globulina (no detectada frente al 0,2%), actividad de PKA (< 0,6 UI/ml frente a 41,2 UI/ml) e IgG 3 (el 4,6% frente al 10,8%) en comparación con la composición final derivada de la segunda parte de la elución de CM-Sefarosa. Además, la composición derivada de la primera parte de la elución de CM-Sefarosa contenía un contenido mucho mayor en IgG (el 94,81% frente al 87,86%) que la composición final derivada de la segunda parte de la elución de CM-Sefarosa.

Ejemplo 8

15 Para validar adicionalmente los resultados proporcionados anteriormente, se preparó una porción de pasta de fracción II (RI10XD142; precipitado A centrifugado) según los métodos proporcionados en el presente documento. Entonces se resuspendió la pasta y se cargó en una columna de intercambio catiónico de CM-Sefarosa tal como se describe en el presente documento y se eluyó tal como se describió anteriormente. Se dividió el eluato (volumen total: 4743 ml) en una primera fracción que contenía el 75% del eluato total (3530 ml) y una segunda fracción que contenía el 25% del eluato total (1213 ml). Entonces se procesaron ambas fracciones de eluato de CM-Sefarosa primera y segunda hasta el recipiente final tal como se describe en el presente documento y se analizaron para determinar la actividad de FXIa, TGA, NAPTT y amidolítica (PL-1), agregado de IgG, y el contenido en AAC. Los resultados se proporcionan en la tabla 10. Concordando con los resultados proporcionados anteriormente, la separación del eluato de CM-Sefarosa en una combinación primera y segunda da como resultado la reducción de la actividad de FXIa y TGA en la preparación de inmunoglobulina final.

25

Tabla 10. Caracterización bioquímica de las fracciones de elución de CM-Sefarosa primera y segunda.

Prueba	Unidad	Primera parte del eluato de CM	Segunda parte del eluato de CM
TGA	% de plasma normal	96,87	256,41
F-XIa específico	mU/ml	< 0,04	2,14
NAPTT	mg	< 5	< 5
Actividad amidolítica (PL-1)	nmol/ml min	< 10	< 10
PKA	UI/ml	< 4	5,9
MDD	% de agregados	0,20	2,82
AAC	%	16,6	58,7

Ejemplo 9

30 Para evaluar adicionalmente la viabilidad de ampliar a escala los métodos proporcionados en el presente documento, se monitorizó un eluato de CM-Sefarosa de un procedimiento de fabricación a gran escala para determinar el contenido en proteína, el pH y la actividad de FXIa. Brevemente, se procesaron aproximadamente 19.000 l de plasma pobre en crioprecipitado, tal como se describe en el presente documento, para formar aproximadamente 220 kg de pasta de fracción II, que contenía aproximadamente 70 kg de proteína. Se resuspendió la pasta de la fracción II y se cargó en una columna de CM-Sefarosa a escala de fabricación, se lavó y se eluyó, tal como se describió anteriormente. Se recogió una muestra del eluato y se analizó tras cada VC (aproximadamente 350 l) de elución. Tal como se muestra en la tabla 11, solo se encuentran niveles elevados de FXIa al final de la elución de CM-Sefarosa, una vez que cambia el pH del eluato. Se monitorizó la concentración de proteína del eluato a DO₂₈₀ y se recogió la primera parte de la elución y se combinó hasta que la DO₂₈₀ disminuyó por debajo de 2,0. Entonces se recogió la segunda parte de la elución y se combinó por separado hasta que la DO₂₈₀ disminuyó por debajo de 0,2. Entonces se analizaron y se compararon las combinaciones de eluato primera y segunda, tal como se muestra en la tabla 12. De manera notable, se encontró el 98% del rendimiento de IgG en la primera parte del eluato de CM y se encontró el 2% del rendimiento de IgG en la segunda parte del eluato de CM. Por tanto, terminando la recogida de una combinación de elución de CM-Sefarosa una vez que la DO₂₈₀ del eluato desciende por debajo de

45

2,0, puede retirarse una cantidad significativa de actividad de TGA y de FXIa de la preparación, mientras que se minimiza la pérdida de rendimiento de IgG.

5 Tabla 11. Caracterización bioquímica de muestras del eluato de CM-Sefarosa tomadas tras la elución de cada volumen de columna.

Muestra (columna 1 de CM-Sefarosa)	Volumen de eluato (l)	DO	pH en la salida de la columna*	TPUV (g/dl)	FXIa (mU/g)
LE08L008 1 VC	355	> 2	4,37	6,57	0,61
LE08L008 2 VC	706	> 2	4,28	1,67	2,40
LE08L008 3 VC	1069	> 2	4,27	0,90	4,44
LE08L008 4 VC	1408	> 2	7,48	0,65	86,55
LE08L008 5 VC	1753	> 2	8,18	0,19	101,07
LE08L008 6 VC	2106	0,85	8,28	0,06	86,24
LE08L008 7 VC	2451	0,26	8,34	0,00	n.d.

Tabla 12. Caracterización bioquímica de las combinaciones de elución de CM-Sefarosa primera y segunda.

Prueba	Unidad	Primera parte del eluato de CM	Segunda parte del eluato de CM (tras DO de 2)
TGA	% de plasma de referencia a 2,4 mg/ml	144,64	366,65
F-XIa	mU/g de IgG	12,53	Actividad similar a factor XIa muy alta; no puede evaluarse cuantitativamente ya que el producto también contiene actividades de FXa y/o FIXa

10 *Ejemplo 10*

15 Para evaluar adicionalmente los métodos divulgados para reducir el contenido amidolítico de una composición de inmunoglobulinas, se realizó un segundo experimento a gran escala, usando un precipitado de la fracción II como material de partida. Brevemente, se preparó el precipitado de la fracción II tal como se describe en el ejemplo 1, excepto en que la separación de precipitado A se realizó mediante filtración, en lugar de mediante centrifugación.

20 Se sometió el precipitado de la fracción II a cromatografía catiónica en CM, tal como se describe en el ejemplo 1. Como en el ejemplo 1, se recogió el eluato de CM en dos combinaciones, una porción delantera (E1) que contenía el volumen del contenido en IgG y una porción trasera (E2) que contenía la mayor parte de la actividad amidolítica. La recogida de la primera parte del eluato (E1) comenzó a DO de 400 mUA y se detuvo tras exactamente 2,7 volúmenes de columna. Se recogió la segunda fracción (E2) del pico de elución hasta que la DO cayó hasta 400 mUA de nuevo. Entonces se procesaron las fracciones eluidas por separado durante el resto del procedimiento. El balance de masas para el procedimiento de purificación se muestra en la tabla 13.

25 Tabla 13. Balance de masas para la segunda purificación a gran escala a partir del precipitado de la fracción II.

	TPUV (%)	Proteína (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento (g/l plasma)
Disolución de la fracción II	6,14	126,72	100,00	3,02
CWSS	5,50	124,50	98,24	2,96
E1 de CM	2,96	108,73	85,80	2,59
E2 de CM	0,90	16,02	12,64	0,38
E1 ANX D/N	2,74	94,82	74,82	2,26
E1 ANX 2M	0,94	10,20	8,05	0,24
E1 EB	4,99	96,20	75,92	2,29
E2 ANX D/N	2,70	13,26	10,46	0,32
E2 ANX 2M	0,95	1,20	0,94	0,03
E2 EB	5,42	11,81	9,32	0,28

30 Como en el ejemplo 1, aproximadamente el 10% de la proteína total se encuentra en la segunda parte del pico de elución. Esta es la pérdida de rendimiento confirmada si la elución se detiene tras 2,7 volúmenes de columna.

Se analizaron los recipientes finales preparados a partir de las dos fracciones de elución de CM (E1 y E2) para determinar la distribución de tamaño molecular, la actividad anti-complementaria, la actividad amidolítica con el sustrato SN13a y con los ensayos de TGA, FXIa y NAPTT. Los resultados se muestran en la tabla 14 y la tabla 15.

Tabla 14. Comparación de la distribución de tamaño molecular de los dos recipientes finales

HPLC	Polímeros	Oligo/Dímeros	Monómeros	Fragmentos
FC de E1	0,24%	5,18%	93,21%	1,36%
FC de E2	4,42%	9,60%	84,55%	1,44%

5 Tabla 15. Comparación de características adicionales de los dos recipientes finales

	PKKA	TGA	FXIa	AAC	SN13a	NAPTT
	PKKA, IU/ml	% de plasma normal	mU/ml de FXIa	Unidades de C'H50 consumidas/%	mU/ml de FXIa	(Plasma con FXI)
FC de E1	< 4	102,76	< 0,04	7,9/9,7%	< 0,375	> 5 mg
FC de E2	< 4	119,75	0,09	52,4/63,7%	3,23	> 5 mg

10 La caracterización bioquímica de los recipientes finales derivados de las partes primera y segunda de la fracción de IgG eluida reveló que la primera parte de la elución está esencialmente libre de FXIa y otras proteínas no deseables que producen niveles elevados de TGA y disminuidos de NAPTT. En cambio, las actividades de FXIa y amidolítica están enriquecidas en la segunda parte, donde el contenido en agregados y oligo/dímeros también es mayor, aunque la separación de suspensión A se realiza mediante filtración. Resulta interesante que el valor de AAC en la primera parte del eluato es incluso menor, mientras que el valor de AAC en la segunda parte del eluato es mayor.

15 En este experimento, cuando se usa filtración para la separación de la suspensión A en el procedimiento anterior, el FXIa residual en la segunda parte de la elución es mucho menor y el valor de TGA del recipiente final de esta parte de elución está en el intervalo normal.

20 Tomado junto con el ejemplo 1, la división de la elución de la columna de ff de CM-Sefarosa en dos fracciones (E1 y E2) permite la fabricación de una composición de IgG que está sustancialmente libre de FXIa. Esto es cierto para ambas opciones de separación para la fracción A (es decir, centrifugación y filtración), aunque FXIa es significativamente menor si la separación del precipitado A se realiza mediante filtración.

25 *Ejemplo 11*

Este ejemplo demuestra la idoneidad de los presentes métodos para la separación de actividades procoagulantes mediante cromatografía de intercambio catiónico en procedimientos de fabricación a gran escala diseñados para la producción de composiciones de inmunoglobulinas para administración subcutánea. El material de partida para este experimento fue un precipitado de la fracción II formado a partir de plasma de origen humano combinado recogido en Europa, que se sometió a crioprecipitación y se usó para recuperar antitrombina III (ATIII) a través de adsorción.

30 Brevemente, tras la crioprecipitación y adsorción de ATIII, comienza el fraccionamiento con alcohol en frío con la separación de fibrinógeno y factores de coagulación residuales (por ejemplo, factor XIII) mediante la precipitación de un precipitado de la fracción I en alcohol al 8% y pH 7,0. Se ajusta la concentración de alcohol en el sobrenadante al 25% con el fin de precipitar la fracción II+III y separar la albúmina. Tras la resuspensión del precipitado II+III, se añade alcohol hasta el 12% a un pH de ~5,2 para formar el precipitado III. Tras la separación del precipitado III, se añaden 0,04 g de DEAE Sephadex/g de proteína, se filtra la disolución a través de filtros de profundidad Cuno 90, y se precipita la fracción II de Cohn que contenía la fracción de gammaglobulina purificada mediante alcohol al 25% a pH neutro.

40 Se disuelve el precipitado de la fracción II en agua fría a 4°C y pH 5,2 ± 0,2. Tras la clarificación mediante filtración en CWSS, se ajusta la disolución para el tratamiento con DD hasta obtener una concentración de proteína del 2%. La temperatura durante la incubación con DD se mantiene en el intervalo de 20 a 25°C. La disolución de proteína se carga en una columna de flujo rápido de CM-Sefarosa equilibrada (tampón de equilibrio: acetato de sodio 0,025 M, pH 5,0 ± 0,2). Tras la carga, se lava la columna con 30 volúmenes de columna de tampón acetato (acetato de sodio 0,01 M, pH 5,5 ± 0,2) para lavar los reactivos de DD antes de eluir la proteína adsorbida con tampón de elución (NaCl 0,25 M, glicina 0,2 M, PEG 3350 al 0,1%, Tris 25 mM, pH 8,00). La recogida de la primera parte del eluato (E1) comienza a DO de 400 mUA y se detiene tras exactamente 2,7 volúmenes de columna. La segunda fracción (E2) del pico de elución se recoge hasta que la DO cae hasta 400 mUA de nuevo. Las fracciones eluidas se procesan por separado hasta el volumen final según las etapas siguientes.

50 Se ajusta el pH de la fracción de eluato a 5,2 y luego la concentración al 5%, tiene lugar la diafiltración frente a tampón de diafiltración (NaCl 0,02 M, PEG 3350 al 0,05%) y la posterior concentración hasta proteína al 10%. Se añaden 0,055 g de glicina/g de proteína a la disolución y se ajusta el pH a 7,0 antes de la filtración en condiciones estériles.

El cromatograma de las etapas de lavado y elución de intercambio catiónico se muestra en la figura 3. La línea 1 muestra la absorbancia UV, la línea 2 la conductividad y la línea 3 el pH en la salida de la columna. La densidad óptica a 280 nm indica una separación parcial de dos fracciones durante la elución de la proteína de la columna de ff de CM-Sefarosa. El pH en la salida de la columna comienza a aumentar justo tras el inicio de la nueva elevación de la absorbancia UV durante la elución. En este punto se separaron las dos fracciones de eluato (F4 y F5, denominadas en el presente documento E1 y E2). El balance de masas para la serie de purificación posterior se muestra en la tabla 16.

Tabla 16. Balance de masas para la purificación a gran escala de IgG a partir del precipitado de la fracción II.

	TPUV (%)	Proteína (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento (g/l de plasma)
Dis. de la frac. II	4,94	179,45	100,00	3,58
CWSS	2,70	169,46	94,43	3,38
E1 de CM	2,78	148,05	82,50	2,95
E2 de CM	0,85	21,04	11,72	0,42
Volumen de E1	13,25	127,60	71,11	2,54
Volumen de E2	13,15	20,32	11,32	0,41

Se encuentra aproximadamente el 15% de la proteína total en la segunda parte del pico de elución (E2). Esta es la pérdida de rendimiento debida a la detención de la recogida de E1 tras 2,7 volúmenes de columna. Se analizaron los recipientes finales preparados a partir de las dos fracciones de elución de CM (E1 y E2) para determinar la distribución de tamaño molecular, la actividad anti-complementaria, la actividad amidolítica con el sustrato SN13a y con los ensayos de TGA, FXIa y NAPTT. Los resultados se muestran en la tabla 17 y la tabla 18.

Tabla 17. Comparación de la distribución de tamaño molecular de los dos recipientes finales.

HPLC	Polímeros	Oligo/Dímeros	Monómeros	Fragmentos
Volumen de E1	0,47%	5,92%	93,61%	-
Volumen de E2	6,33%	8,50%	83,97%	1,20%

Tabla 18. Comparación de características adicionales de los dos recipientes finales.

	PKKA	TGA	FXIa	AAC	SN13a	NAPTT
	PKKA UI/ml	% de plasma normal	ng/ml de FXIa	%	mU/ml de FXIa	(Plasma con FXI)
Volumen de E1	< 4	118,34	0,095	44	< 0,39	> 10 mg
Volumen de E2	16,5	109,11	0,23	57	167	> 10 mg

La primera parte del eluato de CM (E1) dio como resultado un volumen final con menor contenido en agregados, dímeros y fragmentos, con un bajo contenido en FXIa, con un resultado de TGA próximo al del plasma normal, con actividad de PKA y amidolítica tal como se mide con SN-13 por debajo del límite de detección y sin NAPTT disminuido. Las actividades de FXIa, PKKA y similar a FXIa están enriquecidas en la segunda parte, donde el contenido en oligo/dímeros, fragmentos y polímeros de IgG también es mayor. Resulta interesante que el valor de AAC en la porción delantera del eluato (E1) es menor que en la porción trasera del eluato (E2).

Ejemplo 12

Para evaluar adicionalmente los métodos divulgados para reducir el contenido amidolítico de una composición de inmunoglobulinas, se realizó otro experimento a gran escala, usando un precipitado de la fracción II como material de partida. Brevemente, se preparó el precipitado de la fracción II tal como se describe en el ejemplo 11, excepto en que el material de partida para este experimento fue un precipitado de la fracción II formado a partir de plasma de origen humano combinado recogido en Europa, que se sometió a crioprecipitación y se usó para recuperar FEIBA y antitrombina III (ATIII) a través de adsorción. Por lo demás, se usó cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sefarosa y procesamiento posterior tal como se describe en el ejemplo 11.

El cromatograma de las etapas de lavado y elución de intercambio catiónico se muestra en la figura 4. La línea 1 muestra la absorbancia UV, la línea 2 la conductividad y la línea 3 el pH en la salida de la columna. La densidad óptica a 280 nm indica una separación parcial de dos fracciones durante la elución de la proteína de la columna de ff de CM-Sefarosa. El pH en la salida de la columna comienza a aumentar justo tras el inicio de la nueva elevación de la absorbancia UV durante la elución. En este punto, se separaron las dos fracciones de eluato (F4 y F5, denominadas en el presente documento E1 y E2). El balance de masas para la serie de purificación posterior se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Balance de masas para la purificación a gran escala de IgG a partir del precipitado de la fracción II.

	TPUV (%)	Proteína (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento (g/l de plasma)
Dis. de la frac. II	5,09	174,15	100,00	4,03
CWSS	2,98	168,81	96,93	3,91
E1 de CM	2,69	143,69	82,51	3,33
E2 de CM	0,94	21,28	12,22	0,49
Volumen de E1	9,28	127,68	73,32	2,96
Volumen de E2	9,63	19,95	11,46	0,46

Como en el ejemplo 11, se encuentra aproximadamente el 15% de la proteína total en la segunda parte del pico de elución. Esta es la pérdida de rendimiento debida a la detención de la recogida de E1 tras 2,7 volúmenes de columna. Se analizaron los recipientes finales preparados a partir de las dos fracciones de elución de CM (E1 y E2) para determinar la distribución de tamaño molecular, la actividad anti-complementaria, la actividad amidolítica con el sustrato SN13a y con los ensayos de TGA, FXIa y NAPTT. Los resultados se muestran en la tabla 20 y la tabla 21.

Tabla 20. Comparación de la distribución de tamaño molecular de los dos recipientes finales.

HPLC	Polímeros	Oligo/Dímeros	Monómeros	Fragmentos
Volumen de E1	0,54%	4,95%	94,49%	0,02%
Volumen de E2	6,49%	6,71%	85,18%	1,62%

Tabla 21. Comparación de características adicionales de los dos recipientes finales.

	PKKA	TGA	FXIa	AAC	SN13a	NAPTT
	PKKA UI/ml	% de plasma normal	ng/ml de FXIa	%	mU/ml de FXIa	(Plasma con FXI)
Volumen de E1	< 4	114,34	0,081	57	1,15	> 10 mg
Volumen de E2	34,2	157,18	3,208	59	276	> 10 mg

La caracterización bioquímica de los volúmenes estabilizados derivados de las partes primera y segunda de la fracción de IgG eluida reveló que la primera parte de la elución está esencialmente libre de FXIa y otras proteínas no deseables que producen niveles elevados de TGA y disminuidos de NAPTT, mientras que las actividades de PKKA, FXIa y similar a FXIa están enriquecidas en la segunda parte, donde el contenido en oligo/dímeros, polímeros y fragmentos de IgG también es mayor. Los valores de AAC no difieren significativamente en los volúmenes de la primera parte y la segunda parte del eluato. Los resultados confirman en general los hallazgos en el ejemplo 11.

Ejemplo 13

Para evaluar adicionalmente los métodos divulgados para reducir el contenido amidolítico de una composición de inmunoglobulinas, se realizó otro experimento a gran escala, usando un precipitado de la fracción II como material de partida. Brevemente, se preparó el precipitado de la fracción II tal como se describe en el ejemplo 11, excepto en que el material de partida para este experimento fue un precipitado de la fracción II formado a partir de plasma de origen humano combinado recogido en los Estados Unidos, que se sometió a crioprecipitación y se usó para recuperar FEIBA y antitrombina III (ATIII) a través de adsorción. Por lo demás, se usó cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sefarosa y procesamiento posterior tal como se describe en el ejemplo 11.

El cromatograma de las etapas de lavado y elución de intercambio catiónico se muestra en la figura 5. La línea 1 muestra la absorbancia UV, la línea 2 la conductividad y la línea 3 el pH en la salida de la columna. La densidad óptica a 280 nm indica una separación parcial de dos fracciones durante la elución de la proteína de la columna de ff de CM-Sefarosa. El pH en la salida de la columna comienza a aumentar justo tras el inicio de la nueva elevación de la absorbancia UV durante la elución. En este punto, se separaron las dos fracciones de eluato (F4 y F5, denominadas en el presente documento E1 y E2). El balance de masas para la serie de purificación posterior se muestra en la tabla 22.

Tabla 22. Balance de masas para la purificación a gran escala de IgG a partir del precipitado de la fracción II.

	TPUV (%)	Proteína (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento (g/l de plasma)
Dis. de la frac. II	4,02	125,70	100,00	3,09
CWSS	2,31	120,19	95,62	2,95
E1 de CM	2,73	104,01	82,74	2,55
E2 de CM	0,85	18,20	14,48	0,45
Volumen de E1	9,33	91,11	72,49	2,24
Volumen de E2	9,01	16,35	13,00	0,40

Como en el ejemplo 11, se encuentra aproximadamente el 15% de la proteína total en la segunda parte del pico de elución. Esta es la pérdida de rendimiento debida a la detención de la recogida de E1 tras 2,7 volúmenes de columna. Se analizaron de nuevo los recipientes finales preparados a partir de las dos fracciones de elución de CM (E1 y E2) para determinar la distribución de tamaño molecular, la actividad anti-complementaria, actividad de PKKA y similar a FXIa con el sustrato SN13a y con los ensayos de TGA, FXIa y NAPTT. Los resultados se muestran en la tabla 23 y la tabla 24.

Tabla 23. Comparación de la distribución de tamaño molecular de los dos recipientes finales.

HPLC	Polímeros	Oligo/Dímeros	Monómeros	Fragmentos
Volumen de E1	0,67%	5,29%	94,03%	-
Volumen de E2	6,48%	8,92%	83,74%	0,86%

Tabla 24. Comparación de características adicionales de los dos recipientes finales.

	PKKA	TGA	FXIa	AAC	SN13a	NAPTT
	PKKA UI/ml	% de plasma normal	ng/ml de FXIa	%	mU/ml de FXIa	(Plasma con FXI)
Volumen de E1	< 4	109,53	0,080	44	1,23	> 10 mg
Volumen de E2	54,6	148,17	1,652	60	203	> 10 mg

La caracterización bioquímica de los volúmenes finales confirmó los resultados de los ejemplos 11 y 12. La primera parte de la elución (E1) está esencialmente libre de FXIa y otras proteínas no deseables que producen niveles elevados de TGA y disminuidos de NAPTT, mientras que las actividades de FXIa y amidolítica están enriquecidas en la segunda parte (E2), donde el contenido en fragmentos, polímeros y oligo/dímeros también es mayor aunque la separación de suspensión A se realiza mediante filtración. Resulta interesante que el valor de AAC en el volumen estabilizado de la primera parte del eluato sea de nuevo menor que en el volumen de la segunda parte del eluato.

Tomados juntos, los resultados proporcionados en los ejemplos anteriores demuestran que la división del eluato de una columna de ff de CM-Sefarosa en dos fracciones permite la fabricación de una composición de inmunoglobulinas sustancialmente libre de actividades procoagulantes. Esto es cierto para fuentes de plasma variables (UE y EE.UU.) y esquemas de procesamiento anteriores.

Las pérdidas de producto determinadas para las preparaciones de inmunoglobulina descritas en los ejemplos 11 a 13 son mayores que las observadas en los ejemplos 1 a 10. En los ejemplos 11 a 13, la división del pico de eluato tras 2,7 volúmenes de columna da como resultado una pérdida de aproximadamente el 15% de la proteína total. Puesto que el cambio de pH del eluato se produjo posteriormente en los ejemplos 11-15, un corte de elución posterior debería mejorar el rendimiento global, sin poner en peligro significativamente la separación de actividades procoagulantes.

Los datos mostrados anteriormente demuestran que la división de un eluato de cromatografía de intercambio catiónico es un método sólido para la producción de composiciones de inmunoglobulinas que tienen actividades procoagulantes sustancialmente reducidas.

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son únicamente para fines ilustrativos y que los expertos en la técnica sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir el contenido en factor XI (FXI) y/o factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, comprendiendo el método las etapas de:
 - (a) poner en contacto una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía en una primera condición de disolución que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de no más de 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas IgG y al menos una fracción del FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico;
 - (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo en contacto la resina de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende un pH de al menos 7,5 y una conductividad de al menos 15 mS/cm para formar un eluato que comprende una porción delantera y una porción trasera; y
 - (c) recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato, en el que la porción delantera del eluato comprende una composición de inmunoglobulinas IgG que tiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción trasera del eluato contiene una concentración mayor de actividad amidolítica en comparación con la porción delantera del eluato.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el tampón de elución comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm.
3. El método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además una etapa de lavado de la resina de intercambio catiónico que tiene las inmunoglobulinas y FXI y/o FXIa unidos a la misma con un tampón de lavado que comprende un pH de no más de 6,0 y una conductividad de menos de 11 mS/cm antes de eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico en la etapa (b).
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil.
5. El método según la reivindicación 4, en el que la resina de intercambio catiónico débil es una resina de intercambio catiónico de carboximetilo.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tampón de elución comprende un pH de entre 7,5 y 8,5.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el tampón de elución comprende cloruro de sodio entre 200 y 300 mM.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el tampón de elución comprende glicina entre 100 mM y 300 mM.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la porción delantera del eluato consiste en no más del 70% del eluato.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende recoger un eluato que tiene un pH de no más de 7,0 por separado de un eluato que tiene un pH de más de 7,0.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la etapa de recoger la porción delantera del eluato por separado de la porción trasera del eluato comprende monitorizar el pH del eluato.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la etapa de recoger la porción delantera del eluato comprende las subetapas de:
 - (i) monitorizar la densidad óptica del eluato a 280 nm (DO_{280});
 - (ii) empezar la recogida cuando la DO_{280} del eluato se eleva por encima de una primera DO_{280} umbral de al menos 50 mUA; y
 - (iii) finalizar la recogida cuando la DO_{280} del eluato desciende por debajo de una segunda DO_{280} umbral de no menos de 1 ó 2 UA.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, en el que el tampón de lavado comprende un pH de entre 5,0 y 6,0.
- 5 14. El método según la reivindicación 13, en el que el tampón de lavado comprende un pH de $5,5 \pm 0,2$.
15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que menos del 50% del FXI y/o FXIa unido a la resina de intercambio catiónico en la etapa (a) está presente en la porción delantera del eluato recogido en la etapa (c).
- 10 16. El método según la reivindicación 15, en el que la cantidad de FXI y/o FXIa se determina realizando un ensayo de la actividad amidolítica usando un sustrato específico para FXIA.
- 15 17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma proporcionada en la etapa (a) es un precipitado de la fracción plasmática en suspensión seleccionado del grupo que consiste en un precipitado de la fracción I, un precipitado de la fracción I+II+III, un precipitado de la fracción II+III, la fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann y un precipitado modificado de los mismos.
- 20 18. El método según la reivindicación 17, en el que la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma proporcionada en la etapa (a) es un precipitado de la fracción II en suspensión.

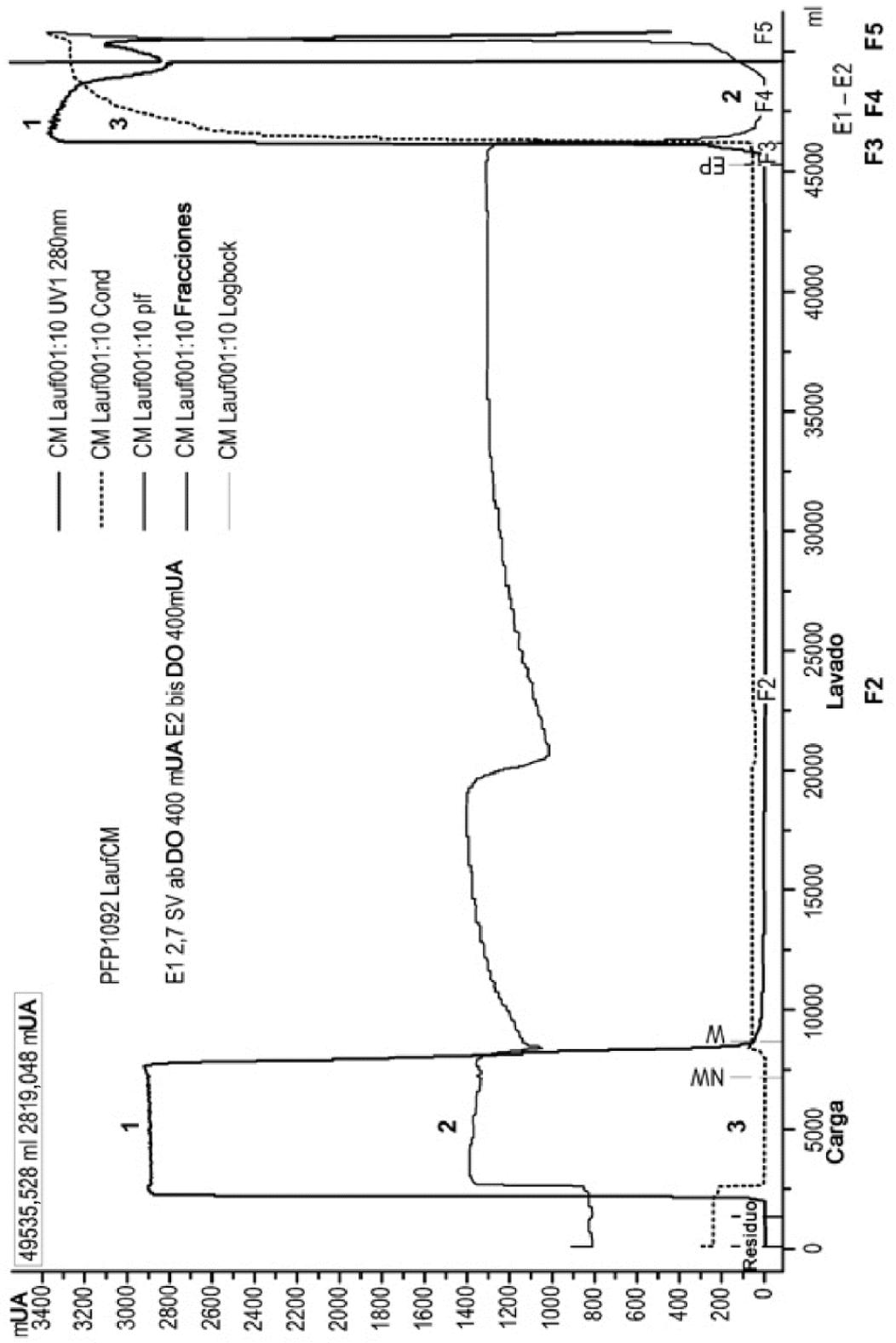


FIG. 1

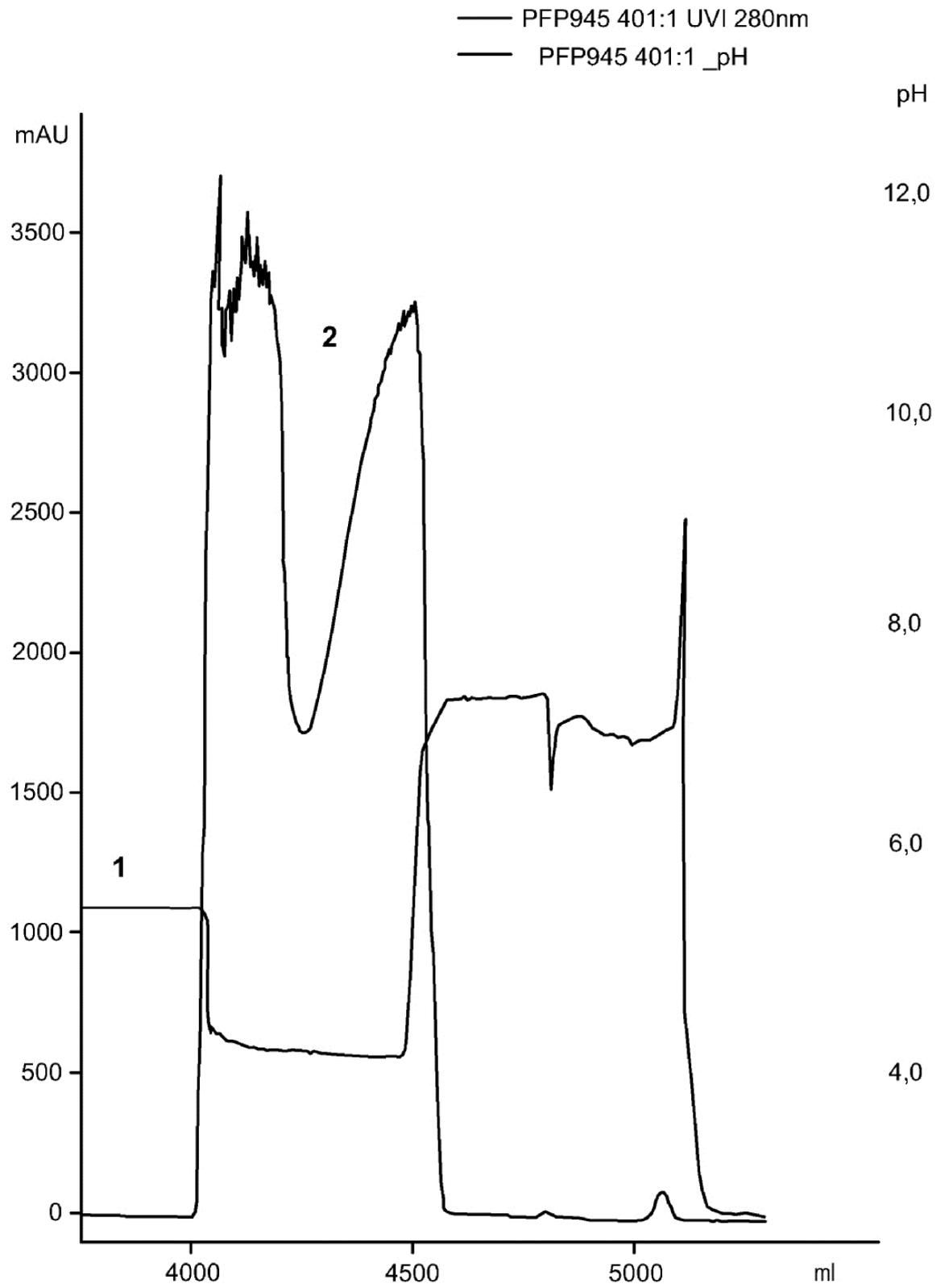


FIG. 2

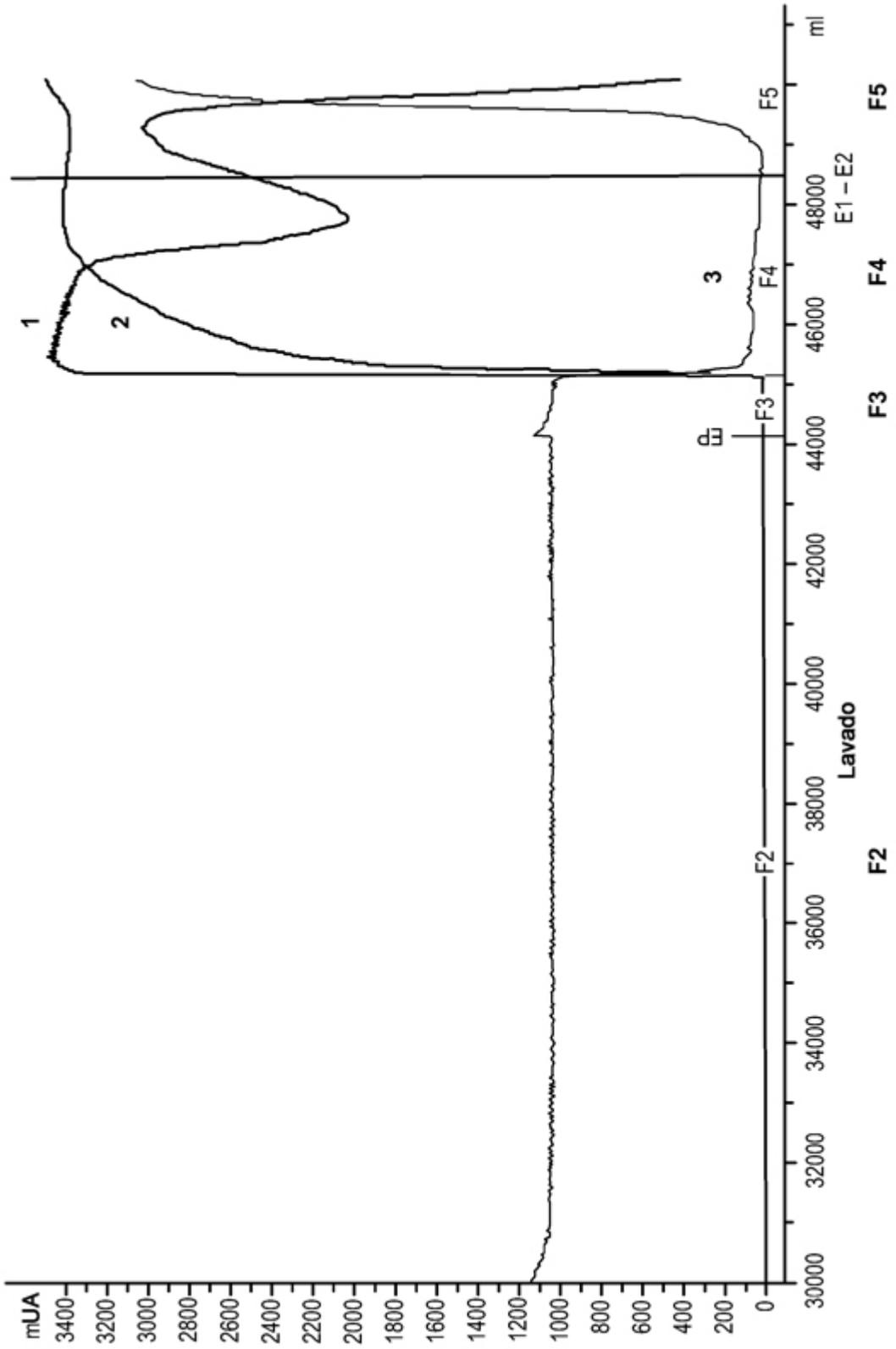


FIG. 3

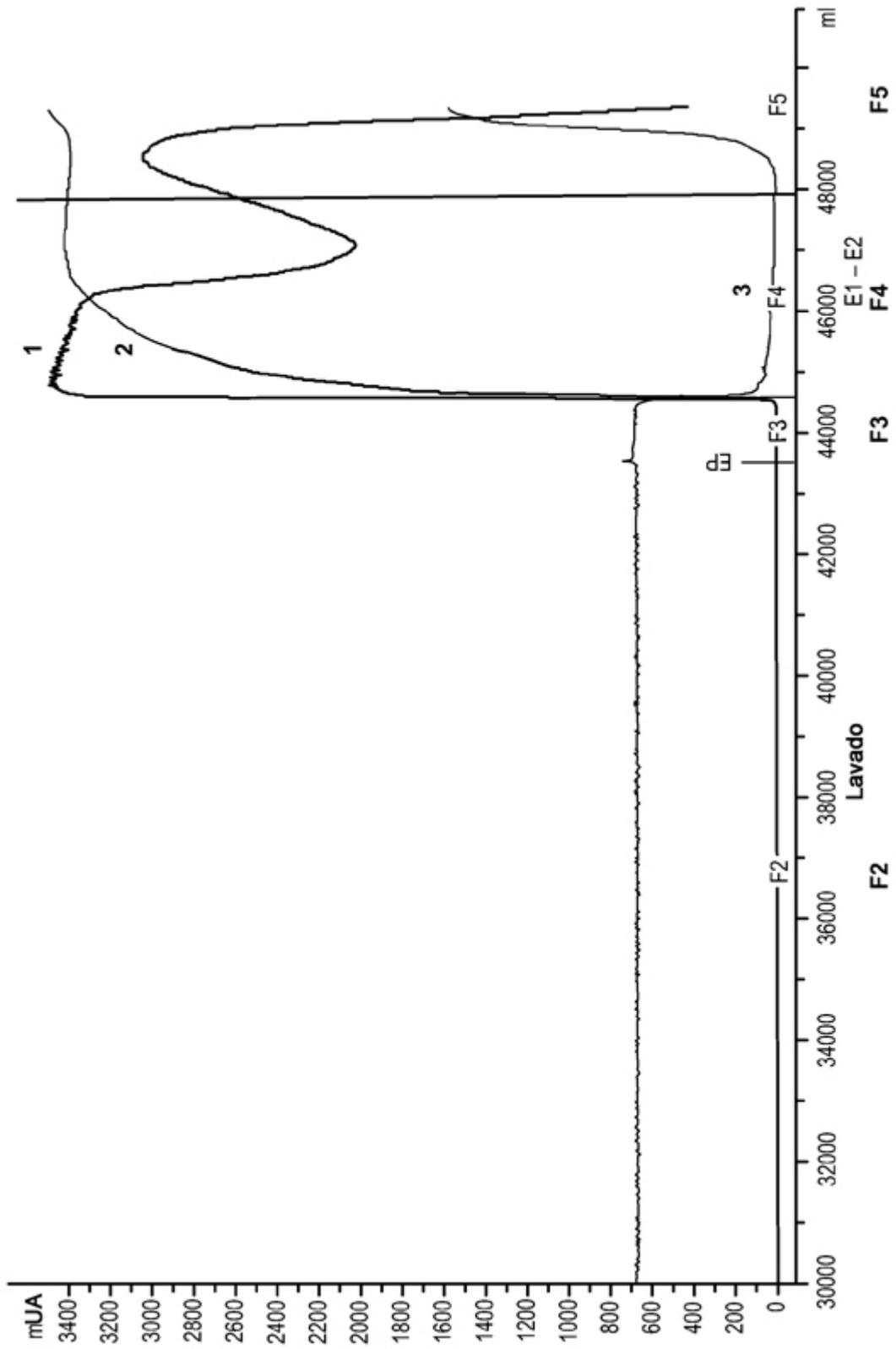


FIG. 4

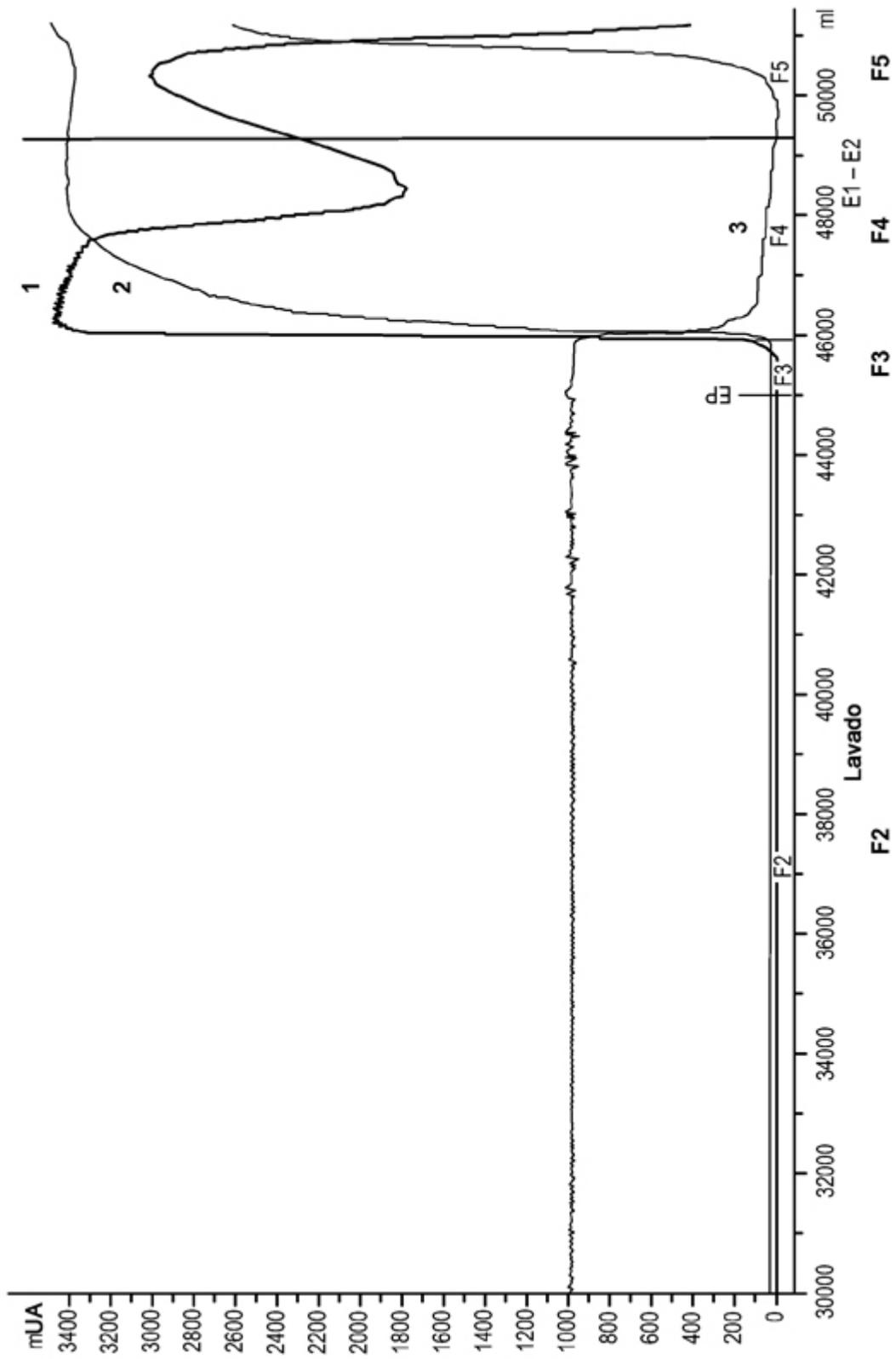


FIG. 5