

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 030**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/06** (2006.01)

**C07K 1/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2012 PCT/EP2012/063549**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13007740**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2012 E 12733726 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2731966**

54 Título: **Procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes**

30 Prioridad:

**11.07.2011 FR 1156285**

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

**18.07.2017**

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU  
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES  
(100.0%)  
3, Avenue des Tropiques ZA de Courtaboeuf  
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**CHTOUROU, ABDESSATAR;  
BATAILLE, DAMIEN y  
MICHAUX, GEORGES**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 625 030 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes para una utilización terapéutica.

10 Las inmunoglobulinas (Ig) son sintetizadas por los linfocitos B y los plasmocitos, que se distribuyen en el plasma, los líquidos extravasculares y las secreciones. Se dividen en 5 categorías, isotipos o clases, en base a su estructura proteica: IgA, IgG, IgM, IgE e IgD. Su distribución natural en el cuerpo humano es la siguiente: IgG: 75%, IgA: 20 %, IgM: 5% y < 1% para IgE y Ig D. Existen normalmente de 8 a 15 g de IgG por litro de plasma. En el plasma, la media de vida de las inmunoglobulinas circulantes de clase IgG, es de aproximadamente 21 días, las de IgA, IgM, IgD, IgE es inferior a 7 días.

- 15 Las inmunoglobulinas polivalentes de origen humano y farmacéuticamente utilizadas están compuestas por un 97% de IgG, que corresponde a la presencia de una gran diversidad de anticuerpos contra diversos agentes infecciosos.

20 La utilización de fracciones de plasma humano enriquecidas en inmunoglobulinas polivalentes para el tratamiento de diversas infecciones o deficiencias congénitas se conoce por su efecto terapéutico. Las inmunoglobulinas polivalentes o normales son administradas para corregir una deficiencia inmunitaria primitiva y ciertos déficits secundarios (leucemias, mielomas o infecciones recidivantes). Se deben disociar de los anticuerpos específicos (anticuerpos citotóxicos anti-Rh o anti-D). Se pueden prescribir a dosis muy elevadas, hasta 2 g/kg/día, para frenar la evolución de ciertas enfermedades, de las que la fisiopatología es poco conocida, pero comprende un componente de tipo inmunitario. La administración de inmunoglobulinas polivalentes ha mostrado su eficacia, al menos transitoria, en el tratamiento de la trombocitopenia de origen inmunológico, también denominada púrpura trombogénica idiopática. Las inmunoglobulinas polivalentes pueden también tener un efecto beneficioso en el tratamiento del síndrome de Guillain-Barré, de las polineuropatías desmielinizantes, de la esclerosis múltiple, del síndrome miasténico de Lambert-Eaton, o de las dermatomiositis.

- 30 Las inmunoglobulinas polivalentes contienen diversas moléculas, por lo que su mecanismo de acción es complejo: interviniendo en varios niveles, modifican el equilibrio inmunitario del paciente y pueden así tener un efecto beneficioso.

35 Varios procedimientos de preparación de concentrados de inmunoglobulinas polivalentes son ya conocidos por el experto en la materia. El procedimiento de preparación más conocido comprende varias etapas de precipitación con etanol (Cohn *et al.* 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459).

40 La patente EP 0703 922 (Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, "Concentré d'immunoglobulines G à usage thérapeutique et procédé de production dudit concentré") describe en particular un procedimiento de producción de un concentrado de inmunoglobulinas G a partir de plasma humano o de sobrenadante de plasma crioprecipitado. Este procedimiento no comprende ninguna precipitación con etanol y comprende una sucesión de etapas de cromatografía y una etapa de inactivación viral por disolvente/detergente. Este método permite sólo dar un rendimiento relativamente bajo, a causa de la sucesión de etapas de cromatografía, incluyendo el procedimiento descrito en efecto dos ciclos de intercambio aniónico y catiónico en tándem así como dos etapas de ultrafiltración.

50 La patente EP 1 385 886 (Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, "Procédé de préparation de concentrés d'immunoglobulines humaines à usage théarapeutique") describe un procedimiento de preparación de concentrados de inmunoglobulinas humanas que comprende una prepurificación por precipitación de contaminantes lipídicos y proteicos y una etapa única de cromatografía efectuada sobre un intercambiador de aniones de pH alcalino. Este método permite obtener hasta 4 g de inmunoglobulinas por litro de plasma inicialmente tratado.

55 La publicación de Tanaka K. *et al.*, 2000 ("High quality human immunoglobulin G purified from Cohn fractions by liquid chromatography" Braz J Med Bio Res 2000, 33(1): 27-30) describe un procedimiento de purificación de inmunoglobulinas G a partir de fracciones "I+II+II" e "II+III" obtenidas según el método de Cohn, por separación por cromatografía sobre tres tipos de geles, dos geles intercambiadores de iones (Q-Sepharose FF y CM- Sepharose FF) y un gel de filtración (Sephacryl S-300 HR). Este procedimiento permite obtener hasta  $4,3 \pm 0,2$  g de inmunoglobulinas G por litro de plasma.

60 El documento WO2007/077365 describe un concentrado de inmunoglobulinas G para uso terapéutico en el que los contenidos respectivos en anticuerpos anti-A y anti-B son conformes a un resultado negativo al ensayo de Coombs indirecto *in vitro*. Este concentrado de IgG presenta además un contenido de IgG polireactivas comprendido entre el 0,01% y el 0,1%, en particular entre el 0,07 y el 0,1%, con respecto al contenido total en IgG. El procedimiento de obtención del concentrado de IgG del documento WO2007/077365, que comprende una etapa de preparación de un concentrado de IgG por fraccionamiento etanólico y/o por separación cromatográfica, asocia una etapa de inactivación viral, una etapa de cromatografía de inmunoafinidad por percolación de dicho concentrado de IgG sobre

una mezcla de soporte cuyas matrices se injertan con grupos oligosacáridos antigénicamente similares a los grupos sanguíneos A y B, y una etapa de filtración de eliminación de virus y/o de partículas de tamaño superior a 20 nm.

5 Sin embargo, habiéndose multiplicado las indicaciones terapéuticas de las inmunoglobulinas, existe una necesidad importante de aumentar el rendimiento de la producción de inmunoglobulinas, asegurándose al mismo tiempo que el producto final presente una pureza elevada y esté desprovisto de contaminantes virales.

10 En consecuencia, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas con un rendimiento superior con respecto a los procedimientos conocidos por el experto en la materia.

15 La invención se refiere así a un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas a partir de una solución inicial de plasma sanguíneo o de una fracción de plasma enriquecida en inmunoglobulinas, caracterizado por que comprende:

(a) una etapa de eliminación de los contaminantes proteicos por el ácido caprílico para obtener una solución desprovista en proteasas, en la que la concentración de ácido caprílico utilizada va del 0,5 al 1,5%, expresada en gramos de ácido caprílico por volumen de solución a tratar,

20 (b) una etapa de clarificación del pH ácido por filtración en profundidad,

(c) seguida de una etapa de cromatografía en lecho fluidizado de la solución desprovista de proteasas,

25 permitiendo dicho procedimiento obtener un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas con un rendimiento superior a 4,5 g de inmunoglobulinas/litro de solución inicial de plasma sanguíneo o de fracción de plasma enriquecida en inmunoglobulinas.

30 La solución obtenida al final de la etapa (a) de eliminación de los contaminantes proteicos por el ácido caprílico del procedimiento de la invención posee una concentración en proteasas conforme a la norma 2.6.15 de la Farmacopea Europea 7.5 edición del 01/2012: 0918, la cual es como máximo de 35 UI/ml, calculada con respecto a una dilución de la preparación a examinar que contiene 30 g/l de inmunoglobulinas.

35 La invención se basa en la constatación de que la combinación de una etapa de eliminación de los contaminantes proteicos por el ácido caprílico con una etapa de cromatografía en lecho fluidizado permite aumentar de manera sorprendente el rendimiento de la producción de inmunoglobulinas.

40 La invención comprende la combinación de una etapa preparada con cuidado para la eliminación de los contaminantes proteicos por el ácido caprílico a pH ácido seguida de una clarificación a pH ácido del sobrenadante obtenido al final de la etapa de tratamiento por el ácido caprílico que permite la fijación de las inmunoglobulinas sobre un gel de cromatografía utilizado en una columna fluidizada (gel del tipo intercambiador aniónico y/o del tipo afinidad y/o del tipo "pseudo-afinidad", preferentemente del tipo "modo-mixto"), lo que permite aumentar el rendimiento de la producción de inmunoglobulinas polivalentes. De manera preferida, la productividad se puede aumentar si las condiciones de elución de las inmunoglobulinas polivalentes del gel de cromatografía permiten una compatibilidad directa con las etapas siguientes del procedimiento sin etapa de formulación por unas técnicas de tipo diálisis o ultrafiltración. De manera particular, el procedimiento según la invención permite obtener una ganancia de productividad del 0,25% de inmunoglobulinas polivalentes por litro de plasma y un producto final que tiene una pureza elevada (99%).

50 El procedimiento de la invención comprende, entre la etapa de eliminación de contaminantes proteicos por el ácido caprílico (a) y la etapa de cromatografía en lecho fluidizado (b), una etapa de clarificación a pH ácido, por filtración en profundidad.

55 Se definirán ventajosamente las etapas de elución a fin de extraer selectivamente las inmunoglobulinas de tipo G (IgG).

La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas a partir de una solución inicial de plasma sanguíneo o de una fracción de plasma enriquecida en inmunoglobulinas, caracterizado por que comprende:

60 (a) una etapa de eliminación de los contaminantes proteicos por el ácido caprílico a pH ácido para obtener una solución desprovista en proteasas,

(b) una etapa de clarificación a pH ácido,

65 (c) una etapa de cromatografía en lecho fluidizado de la solución desprovista en proteasas,

(d) una elución en un tampón de elución de las inmunoglobulinas.

De manera particular, la etapa (b) de clarificación a pH ácido se realiza por una filtración en profundidad basándose en una porosidad lo más elevada posible, pero que permite el paso del sobrenadante clarificado en una columna en lecho fluidizado.

La solución obtenida al final de la etapa (a) de eliminación de los contaminantes proteicos por el ácido caprílico del procedimiento de la invención posee una concentración en proteasas conforme a la norma 2.6.15 de la Farmacopea Europea 7.5 edición 01/2012:0918, la cual es como máximo de 35 UI/ml calculada con respecto a una dilución de la preparación a examinar, que contiene 30 g/l de inmunoglobulinas.

La invención se refiere también al procedimiento tal como se ha descrito anteriormente y que integra después de la etapa (b) de clarificación a pH ácido una etapa de aumento del pH, que corresponde al acondicionamiento de las inmunoglobulinas polivalentes que permite la fijación de estas últimas en un gel de cromatografía utilizado en modo fluidizado.

De manera sorprendente, el concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas obtenido al final del procedimiento de la invención presenta una actividad anti-complementaria inferior al 30%, la cual se determina con referencia al método indicado en la Farmacopea Europea 7.5, edición 01/2012:0918; párrafo 2.6.17.

Se entiende por "inmunoglobulinas polivalentes" en el ámbito de la invención, unas inmunoglobulinas enteras, o unos fragmentos de inmunoglobulinas, tales como F(ab')<sub>2</sub> o F(ab) y cualquier fracción intermedia obtenida durante el procedimiento de fabricación.

Se entiende por "fracción de plasma" cualquier solución sanguínea obtenida después de un tratamiento que permite separar o fraccionar el plasma sanguíneo humano natural, en particular cualquier fracción intermedia obtenida durante el procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes.

Se entiende por "fracción de plasma enriquecida en inmunoglobulinas" una fracción de plasma que contiene un porcentaje de inmunoglobulinas superior al contenido en el plasma humano natural.

Se entiende por precipitado "I+II+III" o "II+III" un precipitado obtenido a partir de plasma sanguíneo fraccionado con etanol según el método de Cohn (Cohn *et al.* 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459) o de Kistler y Nistschmann (1962, Vox Sang. 7, 414).

Se entiende por "contaminantes proteicos" cualquier proteína diferente de las inmunoglobulinas de tipo G, por ejemplo y de manera no limitativa, las inmunoglobulinas de tipo A, E o M, así como las otras proteínas plasmáticas tales como, de manera no limitativa:

- la albúmina, la transferrina, la  $\alpha$ 2-macroglobulina, el plasminógeno, el fibrinógeno, etc.
- los factores de la coagulación tales como, de manera no limitativa, FX, FXI o FXII,
- las proteasas tales como, de manera no limitativa, la calicreína, la precalicreína, o el activador de la precalicreína, y
- las hemaglutininas anti-A y -B.

Se entiende por "cromatografía en lecho fluidizado" una técnica que, por aplicación de un caudal en el sentido inverso de la gravedad sobre unas perlas de cromatografía de densidad elevada, permite disponer un espacio entre estas que permite así el paso en la columna de cromatografía de una solución débilmente clarificada sin generar la obstrucción del flujo de solución. Las cromatografías en lecho fluidizado pueden ser unas cromatografías de tipo intercambio de iones, de tipo afinidad, de tipo "pseudo-afinidad" o de tipo "modo-mixto" (es decir al mismo tiempo intercambio de iones y pseudo-afinidad).

De manera particular, la cromatografía en lecho fluidizado se realiza con el gel UpFront IVIG de tipo "modo-mixto" que comprende la presencia sobre las perlas de un ligando químico que combina unas cargas electroestáticas y unos grupos hidrófobos que confieren una pseudo-afinidad específica para las inmunoglobulinas.

La concentración de ácido caprílico utilizada en el procedimiento según la invención se prepara con cuidado, es decir que la precipitación de los contaminantes se realiza con una concentración final en ácido caprílico suficientemente baja con el fin de no atrapar las inmunoglobulinas polivalentes durante la precipitación de los otros constituyentes de la solución. La concentración en ácido caprílico va del 0,5 al 1,5%, ventajosamente del 0,8 al 1,2%, particularmente del 0,9 al 1,1% y más particularmente es igual al 1% (el porcentaje en ácido caprílico corresponde a unos gramos de ácido caprílico por volumen de solución a tratar).

En un modo de realización, la etapa de eliminación de los contaminantes proteicos por el ácido caprílico se desarrolla a un pH comprendido entre 4,3 y 4,9, preferentemente comprendido entre 4,6 y 4,8.

La solicitante ha constatado de manera sorprendente que la concentración de ácido caprílico utilizada en el procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes según la invención influye directamente en el rendimiento del procedimiento cuando este último comprende una etapa posterior de clarificación. Si la concentración en ácido caprílico es demasiado baja, la precipitación será imperfecta (en particular una parte importante de lípidos permanece en la solución) y la etapa de clarificación será muy difícil de realizar. Por el contrario, si la concentración en ácido caprílico es demasiado alta, las inmunoglobulinas polivalentes quedarán atrapadas en el precipitado formado y no estarán disponibles en el sobrenadante después de la clarificación.

En un modo de realización, se añade una etapa de clarificación a pH ácido entre la etapa de eliminación de los contaminantes proteicos por el ácido caprílico y la etapa de cromatografía en lecho fluidizado. Esta etapa de clarificación a pH ácido se realiza a un valor de pH comprendido entre 4.3 y 4.9, preferentemente entre 4,4 y 4,8 y de manera preferida a un pH comprendido entre 4,6 y 4,8.

La etapa de clarificación a pH ácido según la invención es una etapa de clarificación por filtración en profundidad. Esta clarificación se realiza con el fin de retener sólo las partículas más grandes, que pueden interferir en el funcionamiento del lecho fluidizado. Preferentemente, se utilizan los filtros que tienen un porcentaje de retención nominal de 15 a 100  $\mu\text{m}$ , preferentemente de 25 a 70  $\mu\text{m}$  o de 15 a 40  $\mu\text{m}$ . En un modo de realización, se utilizan en esta etapa los filtros clarificantes de tipo SEITZ T5500 que tienen un índice de retención nominal de 25-70  $\mu\text{m}$ , y más particularmente el filtro T2600 cuyo índice de retención nominal es de 15-40  $\mu\text{m}$ . Se puede utilizar cualquier tipo de filtro, cargado o no, que permita una clarificación equivalente. La clarificación se realiza ventajosamente en presencia de tierras de filtración, que permiten así reducir la superficie de filtro a utilizar. A fin de aumentar la fluidez de la solución a filtrar, la clarificación se realiza ventajosamente entre 4 y 30°C, más particularmente entre 10 y 25°C, por ejemplo entre 20 y 25 °C. De manera ventajosa, el filtro utilizado en la etapa de clarificación según la invención tiene una capacidad de al menos 40 litros por  $\text{m}^2$ , es decir 8 kg de precipitado por  $\text{m}^2$ , más precisamente 55 litros por  $\text{m}^2$ , es decir 11 kg de precipitado por  $\text{m}^2$ .

Al final de la filtración en profundidad, el pH y la osmolalidad del sobrenadante de filtración se ajustan ventajosamente sin etapa de diálisis o de ultrafiltración, en función de las necesidades de la etapa siguiente del procedimiento.

En un modo de realización particular, la etapa de cromatografía en lecho fluidizado puede ser una cromatografía de tipo "modo-mixto" que comprende:

- la carga sobre una columna de cromatografía previamente equilibrada con un tampón a un pH comprendido entre 4,5 y 8, más particularmente entre 4,5 y 7,5; 4,5 y 7,0; 4,5 y 6,8; 4,5 y 6,5; 5,0 y 7,0; 5,0 y 6,5; 5,5 y 6,3; o entre 5,7 y 6,3; de la solución que ha sufrido la etapa de clarificación por filtración en profundidad previamente ajustada al mismo pH, es decir a un pH comprendido entre 4,5 y 8, más particularmente entre 4,5 y 7,5; 4,5 y 7,0; 4,5 y 6,8; 4,5 y 6,5; 5,0 y 7,0; 5,0 y 6,5; 5,5 y 6,3; o entre 5,7 y 6,3,

- el lavado de dicha columna con una solución tampón hasta la eliminación de todas las proteínas no adsorbidas sobre la columna,

- la elución de las inmunoglobulinas polivalentes adsorbidas sobre la columna por un tampón de elución ajustado a un pH comprendido entre 8 y 10, preferentemente entre 8 y 9,8; 8,3 y 9,8; 8,5 y 9,8; 8,8 y 9,8; 9,0 y 9,8; 9,5 y 9,8, y

- la recuperación de la solución enriquecida en inmunoglobulinas polivalentes humanas.

La cromatografía de tipo "modo-mixto" en lecho fluidizado utilizada en la invención utiliza, preferentemente, unas perlas que tienen unos tamaños diferentes, lo que permite estabilizar el lecho de cromatografía. Las perlas utilizadas en la cromatografía de tipo "modo-mixto" en lecho fluidizado según la invención tienen una densidad media de 2,5 a 3,5  $\text{kg/l}$ , un diámetro comprendido entre 20 y 400  $\mu\text{m}$  y una capacidad de fijación de las inmunoglobulinas polivalentes en las condiciones de la invención que pueden ventajosamente superar los 70  $\text{g/l}$ .

La elución utilizada en la cromatografía en lecho fluidizado es, por ejemplo, una elución a pH básico y con baja fuerza iónica, a fin de poder encadenar directamente la etapa siguiente del procedimiento, después de proceder a unos ajustes simples de pH y de conductividad. Un tampón de elución utilizable en el ámbito de la invención puede por ejemplo contener: glicina de 5 a 500 mM, en particular 20 mM, y NaCl de 5 a 500 mM, en particular 20 mM, a pH comprendido entre 7 y 10, en particular comprendido entre 9 y 10, en particular comprendido entre 9,5 y 10, y de manera más interesante entre pH 9,5 y 9,8.

En el caso en el que la etapa después de la cromatografía en lecho fluidizado no sea compatible con unas condiciones de fuerza iónica elevadas, y que, en consecuencia, necesitaría previamente una dilución o una diálisis importante del eluato obtenido al final de la etapa de cromatografía en lecho fluidizado, se puede utilizar un tampón

de elución que tiene un pH elevado pero una fuerza iónica baja. Un tampón de elución utilizable en el ámbito de la invención puede contener por ejemplo: glicina de 5 a 20 mM, en particular 10 mM, a un pH comprendido entre 9,5 y 10,5, en particular comprendido entre 9,8 y 10,5 y de manera más interesante entre pH 9,8 y 10,2.

5 En un modo de realización particular, el procedimiento según la invención comprende además, después de la etapa de cromatografía en lecho fluidizado, una o varias de las etapas siguientes:

(i) una etapa de inactivación viral;

10 (ii) una etapa de cromatografía de intercambio de aniones de la solución obtenida al final de la etapa anterior que tiene como objetivo eliminar los componentes químicos utilizados durante la etapa de inactivación viral y reducir la contaminación en IgA e IgM;

15 (iii) una etapa de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B de la solución obtenida al final de la etapa anterior;

(iv) una etapa de filtración a través de filtros nanométricos de porosidad decreciente de 100 a 15 nm;

(v) una etapa de concentración por ultrafiltración de la solución procedente de la etapa anterior asociada a una etapa de formulación;

20 (vi) una etapa de filtración esterilizante convencional.

El concentrado de inmunoglobulinas polivalentes obtenido según el procedimiento de la invención ha sufrido generalmente al menos una etapa de eliminación o de inactivación de al menos un agente infeccioso. Entre los agentes infecciosos, se pueden citar los virus y los ATNC (agentes transmisibles no convencionales) como el prión. Una inactivación viral comprende frecuentemente un tratamiento con unos productos químicos, por ejemplo por disolvente, y/o detergente y/o por calor, por ejemplo por UVC, irradiación gamma, y/o pasteurización. Una nanofiltración es también útil para eliminar un agente infeccioso, en particular los virus. Preferentemente, el procedimiento comprende al menos un tratamiento por disolvente y detergente, y una nanofiltración. El tratamiento por disolvente y/o detergente (denominado generalmente tratamiento disolvente/detergente) comprende en particular el tratamiento por tri-n-butilfosfato (TnBP) y/o un detergente que se selecciona entre el Triton X-100, el Tween (preferentemente Tween 80), el colato de sodio y el 2-[4-(2,4,4-trimetilpentano-2-il)fenoxi]etanol (Octoxinol). La nanofiltración se refiere generalmente a la filtración del concentrado de inmunoglobulinas polivalentes a través de un filtro con un tamaño de poros inferior a 80 nm. Los filtros disponibles son, por ejemplo, los filtros BioEx, Planova™ 25 75 nm, Planova™ 35 nm, Planova™ 20 nm o Planova™ 15 nm (Asahi corporation), Ultipor DV 50 or DV 20 (Pall corporation), Virosart CPV (Sartorius), Viresolve NFR o NFP (Millipore). Preferentemente, una nanofiltración se realiza antes de la etapa (v) de concentración de las inmunoglobulinas polivalentes por ultrafiltración asociada a una etapa de formulación. En un modo de realización particular, el concentrado de inmunoglobulinas polivalentes purificado se filtra sobre una secuencia de filtros con un tamaño de poros de entre 15 y 50 nm, por ejemplo de 20 o 35 nm.

La cromatografía de intercambio de aniones utilizada en el procedimiento según la invención se efectúa a pH alcalino y baja fuerza iónica para permitir la fijación de las inmunoglobulinas polivalentes. Esta etapa se realiza por ejemplo según el procedimiento descrito en la patente EP 1 385 886 (Laboratoire Français du Fractionnement y des Biotechnologies, "Procédé de préparation de concentrés d'immunoglobulines humaines à usage thérapeutique"). La resina se equilibra por cualquier tampón que tiene un poder de tampón de baja concentración para unos pH comprendidos entre 8,5 y 9,5, tal como los tampones Tris o más particularmente glicina. La concentración en glicina puede estar comprendida entre 5 y 50 mM, por ejemplo entre 5 y 20 mM, y más particularmente entre 8 y 10 mM. El pH se ajustará entre 8,5 y 9,5 y más particularmente entre 8,9 y 9,1.

De manera ventajosa, el eluato de la cromatografía en lecho fluidizado se diluye y ajusta en pH con el fin de permitir la fijación de las inmunoglobulinas polivalentes sobre el soporte cromatográfico intercambiador de aniones. Esta dilución se efectúa con agua a fin de llevar la conductividad por debajo de un valor de 1500  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , y más preferiblemente por debajo de 1100  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . La columna se lava en el tampón de equilibrado, después se eluyen las inmunoglobulinas polivalentes en tampón  $\text{Na}/\text{Na}_2\text{PO}_4$  20 mM a pH 6,2. Finalmente, la columna se lava con una solución de NaCl a 150 mM.

La eliminación de anticuerpo anti-A y anti-B en la solución obtenida a partir de la cromatografía de intercambio de aniones se puede efectuar según el método descrito en la solicitud de patente WO 2007/077365 (Laboratoire Français du Fractionnement y des Biotechnologies, "Concentré d'immunoglobulines G (IgG) appauvri en anticorps anti-A y anti-B y en IgG polyréactives"). La solución obtenida en la etapa anterior se somete a una etapa de eliminación de los anticuerpos anti-A y anti-B por cromatografía de inmunoafinidad por percolación de dicho concentrado de inmunoglobulinas polivalentes sobre una mezcla de soportes cuyas matrices se injertan con grupos oligosacáridos antigénicamente similares a los grupos sanguíneos A y B.

65

En un modo de realización particular de la invención, la solución inicial es plasma sanguíneo o una fracción de plasma enriquecida en inmunoglobulinas por unos métodos bien conocidos por el experto en la materia, y en particular por fraccionamiento etanólico y/o por separación cromatográfica.

5 En un modo de realización particular, la solución inicial es un precipitado "I+II+III" o un precipitado "II+III" obtenido a partir de plasma sanguíneo fraccionado con etanol según el método de Cohn o de Kistler y Nitschmann (1962, Vox Sang. 7, 414) y vuelto a poner en solución. Ventajosamente, el precipitado "I+II+III" o el precipitado "II+III" se vuelve a poner en suspensión en el ámbito de la invención en agua purificada para inyección (ppi) o en una solución que contiene iones. La solución que contiene iones utilizada en el ámbito de la invención puede ser una solución que  
10 comprende NaCl a una concentración inferior o igual a 20 mM, preferentemente comprendida entre 5 y 15 mM, y de manera preferida igual a 10 mM.

En otro modo de realización, poner de nuevo en solución el precipitado "I+II+III" o el precipitado "II+III" se realiza en condiciones que permiten la precipitación del fibrinógeno contaminante. La precipitación del fibrinógeno contaminante puede entonces obtenerse por tratamiento del precipitado "I+II+III" o del precipitado "II+III" con una solución que precipita específicamente el fibrinógeno, por ejemplo una solución de CaCl<sub>2</sub> cuya concentración es inferior o igual a 20 mM, preferentemente comprendida entre 5 y 15 mM, y de manera preferida con una solución de sales 10 mM. En tal modo de realización, el fibrinógeno permanece en forma precipitada mientras que las inmunoglobulinas polivalentes son resolubilizadas.

20 Un modo de realización particular de la invención se refiere a un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas, que comprende:

- (i) una etapa de eliminación de contaminantes proteicos por el ácido caprílico;
- 25 (ii) una etapa de clarificación por filtración en profundidad;
- (iii) una etapa de cromatografía en lecho fluidizado, de tipo "modo-mixto";
- 30 (iv) una etapa de inactivación viral por tratamiento disolvente/detergente;
- (v) una etapa de cromatografía de intercambio de aniones;
- 35 (vi) una etapa de eliminación de los anticuerpos anti-A y anti-B;
- (vii) una filtración a través de filtros nanométricos de porosidad decreciente de 100 a 15 nm;
- (viii) una etapa de concentración por ultrafiltración de la solución procedente de la etapa anterior asociada a una etapa de formulación, después una etapa de filtración esterilizante convencional.

40 En un modo de realización más particular, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas, que comprende:

- 45 (i) el tratamiento de una solución inicial de plasma sanguíneo o de una fracción enriquecida en inmunoglobulinas por fraccionamientos con etanol, para obtener un precipitado "I+II+III" o "II+III", según el método de Cohn (ya citado) o de Kistler y Nitschmann (1962, Vox Sang. 7, 414);
- (ii) volver a poner en solución el precipitado "I+II+III" o "II+III" con agua ppi, bajo agitación, a 20°C (preferiblemente 4 a 15°C). Se pueden proporcionar diferentes iones a fin de facilitar el poner de nuevo en solución las inmunoglobulinas polivalentes antes citadas, por ejemplo unos cationes tales como Na<sup>+</sup>, unos aniones tales como Cl<sup>-</sup>, por ejemplo NaCl. La concentración de sal es inferior o igual a 20 mM, preferentemente comprendida entre 5 y 15 mM, y de manera preferida igual a 10 mM, como por ejemplo NaCl a una molaridad de 10 mM;
- 50 (iii) la precipitación, a partir del precipitado "I+II+III" o "II+III" vuelto a poner en solución, de contaminantes proteicos por el ácido caprílico a una concentración del 0,5 al 1,5%, en particular del 0,8 al 1,2%, particularmente del 0,9 al 1,1%, para obtener una solución plasmática desprovista en proteasas, después el ajuste del pH entre 4,3 y 4,9, preferiblemente entre 4,4 y 4,8, y preferentemente entre 4,6 y 4,8. En un modo de realización, el ajuste del pH se realiza con HCl;
- 55 (iv) la filtración de la solución plasmática desprovista en proteasa procedente de la etapa (iii) a pH ácido por un filtro en profundidad que tiene la porosidad más amplia posible, que permite la inyección del filtrado sobre una columna de cromatografía utilizada en modo lecho fluidizado;
- 60 (v) un ajuste del pH y de la osmolalidad de la solución procedente de la etapa (iv),

65

- (vi) una cromatografía en lecho fluidizado de la solución obtenida al final de la etapa anterior, para obtener una solución sanguínea enriquecida en inmunoglobulinas polivalentes humanas. De manera ventajosa, dicha cromatografía debe permitir una elución de las inmunoglobulinas polivalentes en un tampón similar al tampón necesario para las etapas siguientes del procedimiento, a fin de limitar las pérdidas de inmunoglobulinas polivalentes, que podrán deberse a una etapa de diálisis, de ultrafiltración o cualquier etapa necesaria para la reformulación de la solución;
- (vii) el tratamiento por disolvente/detergente que comprende en particular el tratamiento por tri-n-butilfosfato (TnBP) y/o un detergente que se selecciona entre el Triton X-100, el Tween (preferentemente Tween 80), el colato de sodio y el 2-[4-(2,4,4-trimetilpentano-2-il)fenoxi]etanol (Octoxinol), para inactivar unos virus en la solución obtenida al final de la etapa anterior;
- (viii) la cromatografía de intercambio de aniones de la solución obtenida al final de la etapa anterior, utilizando un gel de polisacárido reticulado o de polímero vinílico, injertado con grupos TMAE a fin de eliminar los disolventes y detergentes utilizados en la etapa anterior y retirar unos contaminantes de tipo IgA e IgM;
- (ix) la cromatografía de afinidad tal como se describe en la solicitud de patente WO 2007/077365 (Laboratoire Français du Fractionnement y des Biotechnologies, "Concentré d'immunoglobulines G (IgG) appauvri en anticorps anti-A y anti-B y en IgG polyréactives") para eliminar los anticuerpos anti-A y anti-B de la solución obtenida al final de la etapa anterior;
- (x) la nanofiltración de la solución obtenida al final de la etapa anterior, utilizando un pre-filtro de porosidad 50 (por ejemplo en un filtro PALL DV20) o 35 nm (por ejemplo en un filtro PLANOVA 35 N), seguida de un filtro de porosidad 20 (por ejemplo un filtro PLANOVA 20 N), o 15 nm (por ejemplo un filtro PLANOVA 20 N o BIOEX) para eliminar unos priones o unos virus resistentes al tratamiento de la etapa (ix);
- (xi) la concentración o diafiltración de la solución obtenida al final de la etapa anterior, para obtener una solución que contiene al menos 50 g/l de inmunoglobulinas polivalentes.
- La solución obtenida al final de la etapa (iii) de eliminación de los contaminantes por el ácido caprílico del procedimiento de la invención posee una concentración en proteasas conforme a la norma 2.6.15 de la Farmacopea Europea 6.7, edición 01/2012:0918, la cual es como máximo de 35 UI/ml, calculada con respecto a una dilución de la preparación a examinar que contiene 30 g/l de inmunoglobulinas.
- La invención tiene también por objeto un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas obtenido por el procedimiento de la invención, caracterizado por que dicho concentrado posee una actividad anti-complementaria inferior al 30%.
- La invención tiene también por objeto un procedimiento de preparación de una composición farmacéutica de inmunoglobulinas polivalentes humanas líquida, congelada o liofilizada, caracterizada por:
- la adición al concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas, obtenido según el procedimiento descrito en la invención, de uno o varios estabilizantes farmacéuticamente aceptables, y
  - opcionalmente, la congelación o la liofilización de la preparación farmacéutica obtenida en la etapa anterior;
- de manera que dicha preparación farmacéutica esté en forma líquida, congelada o liofilizada.
- Los estabilizantes farmacéuticamente aceptables utilizados en el ámbito de la invención son, por ejemplo, los descritos en las solicitudes de patente FR 2 853 551, FR 2 961 107 y FR 2 962 650. La solicitud FR 2 853 551 describe una formulación estabilizante que comprende un azúcar alcohólico tal como el manitol, la glicina y un detergente no iónico. La concentración en manitol está ventajosamente comprendida entre 30 g/l y 50 g/l, la de la glicina entre 7 g/l y 10 g/l, y la del detergente no iónico entre 20 y 50 ppm. La solicitud FR 2 961 107 describe una formulación estabilizante que comprende glicina y un detergente no iónico a un pH inferior o igual a 4,8. La concentración de glicina es al menos de 200 mM, preferentemente de 250 mM  $\pm$  50 mM y la del detergente no iónico está comprendida entre 20 y 100 mg/l, preferentemente 35 mg/l  $\pm$  15 mg/l, más preferentemente 50 mg/l. La solicitud FR 2 962 650 describe la adición a una preparación de inmunoglobulinas G humanas de excipientes seleccionados entre los aminoácidos, los azúcares, los derivados de azúcares, las sales y los tensioactivos, siendo dichos tensioactivos añadidos a una concentración inferior a la concentración micelar crítica de dichos tensioactivos.
- La invención tiene también por objeto la utilización de una composición farmacéutica de inmunoglobulinas polivalentes humanas líquida, congelada o liofilizada, en particular una composición farmacéutica de inmunoglobulinas polivalentes humanas líquida, congelada o liofilizada obtenida según el procedimiento de la invención, para el tratamiento de patologías, tales como las polineuropatías desmielinizantes, la esclerosis múltiple, el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, las dermatomiositis, para el tratamiento sustitutivo en el caso de deficiencias inmunitarias primitivas tales como las agammaglobulinemias congénitas y las hipogammaglobulinemias

congénitas, la deficiencia inmunitaria común variable, la deficiencia inmunitaria combinada severa, el síndrome de Wiskott Aldrich, el mieloma o la leucemia linfocítica crónica con hipogammaglobulinemia secundaria severa e infecciones recurrentes, las infecciones recurrentes en el niño infectado por VIH, o para el tratamiento de deficiencias inmunitarias primitivas con hipogammaglobulinemia o padecimiento funcional de la inmunidad humoral.

5 La presente invención comprende también la utilización de la composición farmacéutica de inmunoglobulinas polivalentes humanas líquida, congelada o liofilizada de la invención para el tratamiento de deficiencias inmunitarias secundarias de la inmunidad humoral, en particular la leucemia linfocítica crónica o el mieloma con hipogammaglobulinemia y asociados a infecciones de repetición, el aloinjerto de células madres hematopoyéticas con hipogammaglobulinemia asociada a una infección, así como el tratamiento inmunomodulador de púrpura trombopénica idiopática (PTI) en el adulto y el niño en caso de riesgo hemorrágico importante o antes de una  
10 operación médica o quirúrgica para corregir el porcentaje de plaquetas, de la retinocoroiditis de Birdshot, del síndrome de Guillain-Barré, de la neuropatía motriz multifocal (NMM), de las polirradiculoneuritis inflamatorias desmielinizantes crónicas (PIDC), y de la enfermedad de Kawasaki.

15 Los ejemplos siguientes describen unos modos de realización del procedimiento según la invención. Los ejemplos siguientes tienen como objetivo ilustrar el objeto de la invención e ilustrar unos modos de realización ventajosos, pero de ninguna manera tienen como objetivo restringir el alcance de la invención.

Ejemplos

20 Ejemplo 1

1.1 Vuelta a poner en solución el precipitado "I+II+III"

25 Se utiliza como material de origen el precipitado "I+II+III" obtenido a partir del plasma sanguíneo fraccionado con etanol según el método de Cohn o de Kistler y Nitschmann (1962, Vox Sang. 7, 414). Este precipitado se vuelve a poner en solución a razón de 56,7 g para 228 ml de agua desmineralizada o proporciones equivalentes. Se agita la mezcla durante 20 minutos a  $15^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Después la temperatura se aumenta a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y el ácido caprílico (1% peso/volumen) se añade lentamente en el precipitado "I+II+III" vuelto a poner en solución. El pH de la solución  
30 obtenida después de la adición de ácido caprílico se ajusta a 4,8, y la solución permanece bajo agitación durante 60 minutos.

1.2 Filtración en profundidad

35 La solución resultante se clarifica por una filtración en profundidad sobre filtro SEITZ® T 2600 (Pall Corporation). Esta filtración retiene al mismo tiempo los adyuvantes de filtración presentes en el precipitado "I+II+III" y el precipitado proteico generado por la adición de ácido caprílico.

El pH de la muestra está también ventajosamente estudiado para optimizar el rendimiento de filtración.

40 El pH de la solución proteica se ajusta a 6,0 únicamente después de la filtración. En efecto, el ajuste del pH de 4,8 a 6,0 genera un ligero precipitado (insolubilidad de las inmunoglobulinas polivalentes) retenido por el filtro y por lo tanto una disminución del rendimiento de filtración en inmunoglobulinas polivalentes.

45 El volumen de aclarado del filtro (agua purificada apirógena) es equivalente al volumen de la muestra de origen a fin de optimizar el rendimiento final.

1.3 Cromatografía de tipo "modo-mixto" en lecho fluidizado

50 Las condiciones de realización son las siguientes:

\* tampón de equilibrado y de lavado: 20 mM de Na/Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 6.

\* tampón de elución: 20 mM glicina/20 mM de NaCl a pH 9,8.

55 La elección de una elución por efecto de pH en un tampón Gly/NaCl permite por simple dilución (ajuste de la conductividad y del pH) obtener una muestra lista para ser inyectada sobre la columna de intercambio de iones (TMAE Fractogel).

60 1.4 Tratamiento por disolvente/detergente

El eluato de la cromatografía de tipo "modo-mixto" en lecho fluidizado según el ejemplo 1.3 sufre un tratamiento de inactivación viral por disolvente/detergente como se describe por Neurath y Horowitz (US 4,764,369).

65 La mezcla disolvente/detergente 10 veces concentrada contiene un 3% de TnBP (tri(n-butil)fosfato) y un 10% de octoxinol. La concentración final en el eluato es de un 0,3% de TnBP y un 1% de octoxinol.

Después de 1 hora de inactivación, se ajusta el eluato a pH 9,0 y diluido en agua para obtener una conductividad inferior a 1100  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

5 1.5 Cromatografía de intercambio de iones

El gel de intercambio de iones utilizado es el TMAE-Fractogel®, Merck.

\* tampón de pre-equilibrado: glicina 80 mM / NaCl 80 mM a pH 9,

10

\* tampón de equilibrado: glicina 9 mM / NaCl 9 mM a pH 9.

Después de la carga de la muestra, la columna se lava con el tampón de equilibrado. Después se eluye en tampón Na/Na<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 20 mM a pH 6,2.

15

1.6 Cromatografía de afinidad

El gel de afinidad utilizado es el Iso A/Iso B Hypercel, Pall Corporation.

20 El eluato de la cromatografía TMAE se somete a esta cromatografía de afinidad, a fin de eliminar los anticuerpos anti-A y anti-B. Las inmunoglobulinas polivalentes de interés atraviesan la columna sin ser retenidas.

\* equilibrado del gel en agua desmineralizada

25 \* recuperación de la fracción no absorbida sin lavado de la columna.

1.7 Filtración

30 La solución proteica procedente de la cromatografía de afinidad se filtra sobre un filtro en profundidad 90LA CUNO, 3M después en un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Los filtros son aclarados con agua y la solución de aclarado se incorpora al filtrado.

1.8 Nanofiltración

35 El filtrado anterior, ajustado a pH 4,5, se pre-filtra en línea sobre un filtro Fluorodyne II 0,1  $\mu\text{m}$ , Pall Corporation y se nanofiltra sobre filtro DV50, Pall Corporatio, después sobre un filtro Planova 20N, Asahi.

1.9 Formulación

40 El producto se pre-concentra a aproximadamente 80 g/l por ultrafiltración sobre un casete de límite de corte 30 kDa, después se diafiltra a volumen constante hasta que la conductividad sea < 600  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . El producto se formula entonces y se ajusta 50 g/l de proteínas.

45 Ejemplo 2: Obtención de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes por la realización del procedimiento de la invención a escala piloto

2.1 Vuelta a poner en solución del precipitado "I+II+III"

50 Se utiliza como material de origen el precipitado "I+II+III" obtenido a partir del plasma sanguíneo fraccionado con etanol según el método de Cohn o de Kistler y Nistschmann (1962, Vox Sang. 7, 414). Este precipitado se vuelve a poner en solución a razón de 3 kg para 12 l de agua desmineralizada. Se agita la mezcla durante 20 minutos a 10°C  $\pm$  3°C. Después la temperatura se sube a 22°C  $\pm$  2°C y el ácido caprílico (1% peso/volumen) se añade lentamente en el precipitado "I+II+III" vuelto a poner en solución. El pH de la solución obtenido después de la adición de ácido caprílico se ajusta a 4,8, y la solución permanece bajo agitación durante 60 minutos.

55

2.2 Filtración en profundidad

60 La solución resultante se clarifica por una filtración en profundidad sobre filtro SEITZ® T 2600 (Pall Corporation). Esta filtración retiene al mismo tiempo los adyuvantes de filtración presentes en el precipitado "I+II+III" y el precipitado proteico generado por la adición de ácido caprílico. Para este ensayo, la superficie utilizada es de 8,7 kg de precipitado/m<sup>2</sup> de media filtrante.

El volumen de aclarado del filtro (agua purificada apirógena) es equivalente al volumen de la muestra de origen, es decir 15 l.

65

### 2.3 Cromatografía de tipo “modo-mixto” en lecho fluidizado

El gel de cromatografía utilizado es el gel Rhobust IGIV, Upfront. 4,3 l de gel en una columna de diámetro de 10 cm. Las condiciones de realización son las siguientes:

5 \* tampón de equilibrado y de lavado: 20 mM de Na/Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 6.

\* tampón de elución: 20 mM glicina/20 mM de NaCl a pH 9,8.

### 10 2.4 Tratamiento por disolvente/detergente

El eluato de la cromatografía de tipo “modo-mixto” en lecho fluidizado sufre un tratamiento de inactivación viral por disolvente/detergente como se describe por Neurath y Horowitz (US 4,764,369).

15 La mezcla disolvente/detergente 10 veces concentrada contiene un 3% de TnBP (tri(n-butil)fosfato) y un 10% de octoxinol. La concentración final en el eluato es de un 0,3% de TnBP y un 1% de octoxinol.

Después de una hora de inactivación, se ajusta el eluato a pH 9,0 y se diluye en agua para obtener una conductividad inferior a 1100 µS/cm.

### 20 2.5 Cromatografía de intercambio de iones

El gel de intercambio de iones utilizado es el EMD-TMAE-Fractogel®, Merck.

25 4 litros en una columna de 12,7 cm de diámetro.

\* tampón de pre-equilibrado: glicina 80 mM / NaCl 80 mM a pH 9,

30 \* tampón de equilibrado: glicina 9 mM / NaCl 9 mM a pH 9.

Después de la carga de la muestra, la columna se lava con el tampón de equilibrado. Después se eluye en tampón Na/Na<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 20 mM a pH 6,2.

### 35 2.6 Cromatografía de afinidad

El gel de afinidad utilizado es el Iso A/Iso B Hypercel, Pall Corporation. 154 ml de gel en una columna de 7 cm de diámetro.

40 El eluato de la cromatografía TMAE se somete a esta cromatografía de afinidad, a fin de eliminar los anticuerpos anti-A y anti-B. Las inmunoglobulinas polivalentes de interés atraviesan la columna sin ser retenidas.

\* equilibrado del gel en agua desmineralizada

45 \* recuperación de la fracción no absorbida sin lavado de la columna.

### 2.7 Filtración

50 La solución proteica procedente de la cromatografía de afinidad Iso A/Iso B Hypercel se filtra sobre un filtro en profundidad 90LA CUNO, 3M después en un filtro de 0,2 µm. El aclarado de los filtros en agua se incorpora al filtrado.

### 2.8 Nanofiltración

55 El filtrado anterior, ajustado a pH 4,5, se prefiltra en línea sobre un filtro Fluorodyne II 0,1 µm, Pall Corporation y se nanofiltrar sobre filtro DV50, Pall Corporation, después sobre un filtro Planova 20N, Asahi.

### 2.9 Formulación

60 El producto se pre-concentra a aproximadamente 80 g/l por ultrafiltración sobre un casete de límite de corte 30 kDa, después se diafiltra a volumen constante hasta que la conductividad sea < 600 µS/cm. El producto se formula entonces y se ajusta a 50 g/l de proteínas.

Ejemplo 3: Rendimiento del procedimiento

Se han realizado tres lotes con tres precipitados "I+II+III" diferentes según el procedimiento según la invención descrito en el ejemplo 1 y precisado en el ejemplo 3. La eliminación de las proteasas se obtiene con un 1% de ácido caprílico. La filtración se efectúa en filtro-prensa sobre placas SEITZ T2600.

- 5 Se trata un lote control según el procedimiento de referencia, tal como se describe en la solicitud de patente EP 1 385 886.

Los resultados de rendimiento del nuevo procedimiento se muestran en la tabla siguiente:

- 10 Rendimientos acumulados en g/l de proteínas o de Ig de plasma en la fase concentrado formulado

	Lote según la invención	Lote control tratado según el procedimiento tal como se describe en el documento EP 1 385 886
	10AXTO1064 015 (Lot 1)	10AXTO1064 038
Rendimiento en g de proteínas por litro de plasma tratado.	5,22	4,67
Rendimiento en g de Ig polivalentes por litro de plasma tratado	4,75	4,49

- 15 El procedimiento según la invención permite aumentar el rendimiento en g de inmunoglobulinas polivalentes por litro de plasma tratado, con respecto al procedimiento de referencia (EP 1 385 886).

La ganancia en el ejemplo anterior es de 0,26 g de IgG/l de plasma, entre el lote según la invención y el lote control realizado a partir del mismo precipitado.

- 20 Ejemplo 4: Actividad anti-complementaria

- Se han realizado tres lotes exploratorios según el procedimiento de la invención a tamaño piloto a partir de tres precipitados "I+II+II" diferentes. Estos lotes se han comparado con un lote realizado a la misma escala (tamaño piloto), pero según el procedimiento industrial de producción de las inmunoglobulinas por intravenosa, tal como se describe en la patente EP 1 385 886, y con tres lotes industriales preparados según el procedimiento descrito en la solicitud EP 1 385 886 fabricados a partir de los mismos precipitados.

Un lote fabricado al tamaño piloto corresponde a un lote cuyo tamaño representa al menos un 10% del lote industrial.

- 30 Los lotes según la invención presentan una actividad anti-complementaria (AAC) medida según el ensayo de la Farmacopea europea 7.5, edición 01/2012:0918, párrafo 2.6.17, siempre inferior a las de los lotes realizados según el procedimiento descrito en la solicitud EP 1 385 886. Por otro lado, la progresión observada en 18 meses sobre este criterio es menor para los lotes realizados según la invención.

- 35 Los resultados de actividad anti-complementaria (AAC) se muestran en la tabla siguiente:

	T = 0	T = +18 meses	Progresión (%)
Lotes exploratorios fabricados al tamaño piloto preparados según el procedimiento de la invención:	AAC %	AAC %	
Lote 1*	28	31	11%
Lote 2**	27	31	15%
Lote 3***	27	31	15%
Lote fabricado al tamaño piloto* preparado según el procedimiento descrito en la solicitud EP 1 385 886 :	33	40	21%
Lotes industriales preparados según el procedimiento descrito en la solicitud EP 1 385 886 :			
Lote industrial 1*	36	38	6%
Lote industrial 2**	32	39	22%
Lote industrial 3***	32	37	16%

\*, \*\*, \*\*\* lotes realizados con los mismos precipitados

- 40 El procedimiento de la invención permite por lo tanto obtener un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes cuya actividad anti-complementaria es inferior al 30%.

Ejemplo 5: Pureza de las inmunoglobulinas producidas según el procedimiento de la invención.

Los datos analíticos de pureza para los lotes pilotos descritos en el ejemplo 2 se resumen en la tabla siguiente.

análisis	Método de medición	Lote Piloto N°1		Lote Piloto N°2		Lote Piloto N°3		Media de lotes industriales obtenidos según el procedimiento descrito en la solicitud EP 1 385 886	
pH	Ph.Eur (2.2.35)	5,0		4,8		4,8		4,9	
Osmolalidad mosmol/kg	Ph.Eur (2.2.29)	297		294		299		297	
DTM polímeros (%)	Ph.Eur (2.2.29)	<0,4		<0,4		<0,4		0,5	
Dímeros (%)	Ph.Eur (2.2.29)	2,7		3,7		2,4		ND	
Monómeros (%)	Ph.Eur (2.2.29)	96,3		95,3		96,4		98,7 *	
Fragmentos (%)	Ph.Eur (2.2.29)	1		1,1		1,1		1	
Proteínas totales (g/l)	Ph.Eur (2.5.33)	51		49		49		50	
Porcentaje de proteínas (%)	Ph.Eur (2.5.33)	98		98		98			
			% proteínas		% proteínas		% proteínas		% proteínas
IgG g/l	Nefelometría **	46,4	91	46	95	47,6	96	45,7	92
IgG1 g/l	Nefelometría **	29,5	58	27,1	56	26,7	54	28	56
IgG2 g/l	Nefelometría **	18	35	17,8	37	16,7	34	16,1	32
IgG3 g/l	Nefelometría **	1,4	3	1,2	2	1,3	3	1,1	2
IgG4 g/l	Nefelometría **	1,1	2	1	2	1	2	0,9	2
IgGA g/l	ELISA ***	7,4	0,01	7,1	0,01	6	0,01	8,6	0,02
IgGE g/l	Nefelometría **	<0,8	ND	<0,8	ND	<0,8	ND	<0,8	ND
IgGM g/l	Nefelometría **	0,23		0,2		0,18		0,16	
Anticuerpos anti-Hbs Ag (UI/ml)	ELISA ***	5,1		3,5		3,3		4,6	
Albúmina mg/l	Nefelometría **	<2,2		<2,2		<2,2		<2,2	
Tranferrina mg/l	Nefelometría **	<2,1		<2,1		<2,1		<2,1	
Activador de la precalicreína	Ph.Eur (2.6.15)	<1		<1		<1		<2	
Hemaglutininas anti-A	Ph.Eur (2.6.20)	4		16		8		8	
Hemaglutininas anti-B	Ph.Eur (2.6.20)	2		4		8		4	
Actividad anti-complementaria%	Ph.Eur (2.6.17)	28		27		27		33	

5 Ph.Eur: Farmacopea Europea 6ª edición

\* Monómeros + dímeros

10 \*\* Pressac M, Later R. "Dosages sériques d'IgG, IgA, IgM, transferrine y haptoglobine. II Précision analytique y comparaison des résultats fournis par différents analyseurs". Ann Biol Clin 1995; 53: 273-81

\*\*\* R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne y J. Kuby, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", in Immunology, 5ª edición, páginas 148-150, W. H. Freeman, New York, 2003.

15 La suma "monómeros + dímeros", la distribución de las subclases, los porcentajes de contaminantes y la actividad anticomplementaria son equivalentes para las inmunoglobulinas procedentes del procedimiento de la invención o del procedimiento de referencia según la patente EP 1 385 886. Estas características satisfacen los criterios de la Farmacopea Europea.

20 Ejemplo 6: Estabilidad de las inmunoglobulinas producidas según el procedimiento de la invención

Los productos formulados procedentes de los lotes pilotos descritos en el ejemplo 2 se han conservado a 4°C y unas alícuotas de lotes industriales realizados con los mismos precipitados de origen se han conservado en la misma fase

## ES 2 625 030 T3

en las mismas condiciones. Unas extracciones efectuadas cada seis meses han permitido observar sobre tres criterios las diferencias entre los lotes obtenidos según la invención (lotes pilotos 1, 2 y 3) y los lotes obtenidos según el procedimiento industrial de referencia EP 1 385 886 (lotes industriales 1, 2 y 3). Los tres criterios medidos son los siguientes:

- 5 - la medición de la concentración en inmunoglobulinas G (IgG) y la de la concentración en inmunoglobulinas anti-Hbs según el método descrito en la Farmacopea Europea 6.7 (Pharmeuropa, volumen 21, número 2, abril de 2009), párrafo 2.7.1, y
- 10 - la determinación del tamaño molecular (polímeros, dímeros, monómeros y fragmentos) según el método descrito en la Farmacopea Europea 6.7 (Pharmeuropa, volumen 21, número 2, abril de 2009), párrafo 2.2.29.

La tabla siguiente da cuenta de estas diferencias:

	T= 0			T= +6 meses		
	IgG g/l	Ig aHbs UEmI	DTM % (agregados / dímeros / monómeros / fragmentos)	IgG g/l	Ig aHbs UEmI	DTM % (agregados / dímeros / monómeros / fragmentos)
Lotes preparados según el procedimiento de la invención:						
Lote piloto 1 *	46,4	5,1	<0,4/2,7/96,3/1,0	43,7	5,2	< 0,4/5,7/93,4/<1,0
Lote piloto 2**	46,0	3,5	<0,4/3,7/95,3/1,1	42,7	3,5	<0,4/5,2/93,7/1,1
Lote piloto 3***	47,6	3,3	<0,4/2,4/96,4/1,1	43,5	3,0	<0,4/4,3/94,6/1,0
Lote fabricado con el tamaño piloto* preparado según el procedimiento descrito en el documento EP1385886:	49,6	6,1	< 0,4/3,6/95,7/<1	45,3	5,4	<0,4/5,1/93,9/<1,0
Lotes industriales preparados según el procedimiento descrito en el documento EP1385886:						
Lote industrial 1 *	45,9	5,1	0,4/98,8/1,1	46,6	5,5	<0,4/4,8/94,1/1,0
Lote industrial 2**	46,0	4,7	0,7/98,6/1,0	44,9	4,4	0,9/5,1/93,2/<1,0
Lote industrial 3***	45,2	3,9	0,4/98,6/1,0	44,4	3,5	< 0,4/4,6/94,3/<1,0

	T= +12 meses			T= +18 meses		
	IgG g/l	Ig aHbs UEmI	DTM % (agregados / dímeros / monómeros / fragmentos)	IgG g/l	Ig aHbs UEmI	DTM % (agregados / dímeros / monómeros / fragmentos)
Lotes preparados según el procedimiento de la invención:						
Lote piloto 1 *	51,7	5,2	<0,4/5,6/93,3/1,0	48,5	5,0	<0,4/4,8/94,1/1,0
Lote piloto 2**	49,7	3,7	< 0,4/5,3/93,7/<1,0	45,7	3,3	<0,4/4,4/94,5/1,1
Lote piloto 3***	49,5	3,2	<0,4/4,7/94,3/1,0	47,6	3,1	<0,4/4,4/94,5/1,1

## ES 2 625 030 T3

Lote fabricado con el tamaño piloto * preparado según el procedimiento descrito en el documento EP1385886	51,8	5,7	<0,4/5,4/93,6/<1,0	49,1	5,4	<0,1/5,2/93,8/1,0
Lotes industriales preparados según el procedimiento descrito en el documento EP1385886: Lote industrial 1 *	51,4	5,9	<0,4/4,8/93,6/1,0	46,5	5,3	<0,4/4,1/94,8/1,0
Lote industrial 2**	48,2	4,5	0,7/4,8/93,6/1,0	46,2	4,3	0,7/4,9/93,5/1,0
Lote industrial 3***	49,5	3,7	<0,4/4,4/94,4/1,0	47,1	3,4	<0,4/4,4/94,4/1,0

\*, \*\*, \*\*\*, lotes realizados con los mismos precipitados

El análisis de los datos muestra:

- 5
- una estabilidad de la concentración en IgG sobre 18 meses y una homogeneidad de 7 lotes,
  - una estabilidad de la concentración de los Ig anti-Hbs sobre 18 meses: siendo cada lote específico de este criterio,
- 10
- una suma "monómeros + dímeros" constante y superior al 85% requerido por la Farmacopea, para cada lote sobre 18 meses.

Ejemplo 7: Procedimiento que comprende una etapa de precipitación caprítica, de clarificación y una etapa de cromatografía de tipo "modo-mixto" en lecho fluidizado.

- 15
- El tratamiento con ácido caprítico tiene como objetivo la eliminación por precipitación (permaneciendo las inmunoglobulinas en solución) de una parte de las proteínas contaminantes procedentes del plasma y muy particularmente de proteasas. En función del porcentaje de ácido caprítico utilizado y del método de separación del sobrenadante y del precipitado, se puede perder una parte más o menos importante de las inmunoglobulinas. Se han ensayado unas condiciones experimentales con el fin de tener la clarificación más basta posible compatible con la cromatografía en lecho fluidizado y que genere la menor pérdida en inmunoglobulinas. Para eso, unos filtros de porosidad creciente se han comparado sin precipitación caprítica en una primera fase, y después se han confirmado con el tratamiento con el ácido caprítico a diferentes concentraciones.

- 25
- Ensayo sobre filtro de diámetro 90, es decir 50 cm<sup>2</sup> (con aclarado).

Ninguna precipitación con el ácido caprítico.

N° de ensayo	440 077	440 078	440 079
Tipo de filtro	Pall Supradur50P	Pall/Seitz T 5500	Pall/Seitz T 2600
Porosidad	4-8 µm	25-70 µm	15-40 µm
pH	4,8	4,8	4,8
Volumen pasado ml	150	150	150
Aclarado pasado	0	75	75
Volumen recuperado ml	9 (agua)	208	216
IgG inicial g/l	14,35	15,05	15,05
IgG filtrado g/l	ND*	10,5	10,2
Rendimiento %	ND*	97	98
Volumen/Superficie l/m <sup>2</sup>	ND*	30	30

- 30
- \* obstrucción del filtro, ninguna determinación efectuada

Estos resultados muestran que una porosidad mínima del orden de 10-20 µm debe ser realizada a fin de limitar la pérdida en IgG debida a la obstrucción. El filtro T2600 se seleccionó con respecto al filtro T5500 para su porosidad más baja a un rendimiento en IgG equivalente.

35

## ES 2 625 030 T3

Al tener el porcentaje de ácido caprílico añadido un impacto sobre la precipitación de las proteasas y sobre la filtrabilidad de la solución, se analizó un intervalo de ácido caprílico que va del 0,5 al 1% sin adición de adyuvante de filtración. Los resultados obtenidos son comparados con los que resultan de una clarificación control por simple centrifugación.

- 5 Ensayo – Vuelta a poner en suspensión (RES) un 1% de ácido caprílico – filtro de diámetro 90, es decir 50 cm<sup>2</sup>, carga de 210 ml

			RES pH 4,8(1)	RES clarificada (2)
Ensayo A	1% Filtración SEITZ 2600	IgG g/l	13,7	9,7
		Rendimiento (Rdt) %	100	76(3)
		Proteasas mDO/ml	570	13
Ensayo B	0,5% Filtración SEITZ 2600	IgG g/l	15	9,4
		Rdt %	100	51 (3)
		Proteasas mDO/ml	NR	NR
Ensayo C	0,5% Centrifugación	IgG g/l	14,1	12,4
		Rdt %	100	72
		Proteasas mDO/ml	967	250

- 10 (1): Precipitado vuelto a poner en solución ajustada a pH 4,8 antes de la clarificación

(2): Precipitado vuelto a poner en solución ajustada a pH y clarificado

- 15 (3): Aclarado de los filtros con un volumen que corresponde a la mitad del producto a clarificar.

El control por centrifugación muestra que una parte de las inmunoglobulinas se pierde en el precipitado, si este no se aclara, esta técnica no se conserva. La condición más interesante ensayada es la concentración de un 1% de ácido caprílico: la contaminación en proteasas es baja y la pérdida en inmunoglobulinas es inferior al 30%. Una concentración de un 1% de ácido caprílico parece por lo tanto ser el mejor compromiso entre la filtrabilidad, el rendimiento y la eliminación de las proteasas.

20 A fin de aumentar el rendimiento, el ensayo anterior se ha realizado con una carga más baja (180 ml en lugar de 210) y aumentando el volumen de lavado del precipitado con el tampón de aclarado, tal como se describe en la tabla siguiente.

- 25 Ensayo 09AXTO440 126 – RES 1% ácido caprílico – filtro de Ø90, es decir 50 cm<sup>2</sup>, carga de 180 ml.

Etapas	Volumen (ml)	IgG (g/l)	Cantidad (mg)	Rendimiento (Rdt) %
RES pH 4,8	210	13,65	2866,5	100
RES filtrada	180	11,2	2016,0	70,3
Aclarado 1	30	3,71	111,3	3,9
Aclarado 2	30	2,26	67,8	2,4
Aclarado 3	30	2,28	68,4	2,4
Aclarado 4	30	1,71	51,3	1,8
Aclarado 5	30	1,16	34,8	1,2
Aclarado 6	30	0,91	27,3	1
Aclarado 7	30	0,91	27,3	1
Pool filtrado	385	6,95	2675,8	93,3

30 Disminuyendo el volumen de carga sobre el filtro y aclarando el precipitado con un volumen de lavado equivalente al volumen de producto a clarificar (180 ml), no se observa ninguna obstrucción, y se recupera la totalidad de las inmunoglobulinas. La totalidad de las inmunoglobulinas está disponible para la etapa de cromatografía de afinidad que sigue en el procedimiento de purificación.

35 Ejemplo 8: Mejora de la puesta de nuevo en solución de las IgG

Durante la fabricación de los lotes tamaño piloto según el nuevo procedimiento, tal como se ha descrito en el ejemplo 2, la comparación con el lote preparado según el procedimiento descrito en la solicitud de patente EP 1 385 886 a la misma escala (10AXTO1064015) muestra que se puede mejorar ventajosamente la puesta de nuevo en solución del precipitado "I+II+III". En efecto, se observa en esta etapa una diferencia de al menos 1 g/l de IgG (siendo los volúmenes equivalentes) como lo demuestra la tabla siguiente.

<b>Puesta de nuevo en solución no filtrada</b>			
Lote de tamaño piloto preparado según el procedimiento descrito en la solicitud de patente EP 1 385 886 (g/l) *	Lotes de tamaño piloto preparados según el procedimiento de la invención (g/l)		
	Lote 1*	Lote 2	Lote 3
12,8	11,6	10,3	11,7

\* lotes realizados con el mismo precipitado

5 Unos ensayos complementarios han mostrado que la puesta de nuevo en solución de las inmunoglobulinas presentes en el precipitado puede ser ventajosamente efectuada con una solución que contiene unos iones en lugar de con agua purificada. En particular, utilizando una solución de NaCl 10 mM.

10 Por otro lado, la precipitación de los contaminantes proteicos por el ácido caprílico puede ser también mejorada a unos pH inferiores a 4,8. En particular, un pH de 4,6 permite esta mejora.

15 Un lote de tamaño piloto ("nuevo lote") se ha realizado teniendo en cuenta estas mejoras y se ha comparado con la fase "Eluato cromatografía Robusta" con los tres lotes (lotes 1, 2 y 3) ya realizados según la invención.

La tabla siguiente da cuenta de las diferencias:

Rendimiento del nuevo procedimiento en la fase "eluato de la cromatografía en lecho fluidizado"

	Nuevo lote	Lote 1	Lote 2	Lote 3
pH de RES	4,6	4,8	4,8	4,8
g IgG/l plasma	6,00	5,96	5,62	5,77
IgG/Proteínas	0,910	0,820	0,812	0,893

20 El nuevo lote, realizado con una puesta de nuevo en solución con una solución que tiene una concentración en NaCl de 10 mM, tratado por el ácido caprílico y ajustado a un pH igual a 4,6 presenta:

- 25 - un mejor rendimiento en inmunoglobulinas por litro de plasma utilizado,
- una mejor pureza frente a la relación inmunológico/proteínas totales.

Ejemplo 9: Aplicación de la invención al precipitado "II+III"

30 El precipitado "II+III" es una alternativa al precipitado "I+II+III" como fuente de materia prima para la purificación de IgG policlonales.

35 En base a esto, se han realizado dos lotes según la invención a partir de precipitados "II+III" diferentes. Los resultados de las primeras evaluaciones obtenidos a partir de estas dos materias primas se compararon en la fase "eluato de la cromatografía en lecho fluidizado".

La tabla siguiente da cuenta de estos resultados:

	Lote "I+II+III"	Lote "II+III"	Lote "II+III"
pH de RES	4,6	4,6	4,6
g IgG/l de plasma	6,00	5,17	5,1
Rendimiento de purificación %	98	88	95
IgG/Proteínas	0,910	0,837	0,859

40 Estos resultados muestran que la realización de las primeras etapas del procedimiento según la invención se desarrolla de manera equivalente con los dos tipos de precipitado:

- 45 - de rendimiento de extracción: los rendimientos acumulados de las etapas de clarificación y de cromatografía de afinidad Robusta son comparables, incluso si uno de los lotes está un poco hacia atrás.

Sin embargo, los precipitados "II+III" que han sufrido una etapa de fraccionamiento etanólico suplementario con respecto al precipitado "I+II+III" presentan un rendimiento en g de IgG/l de plasma del 15% inferior al obtenido con el precipitado "I+II+III". Este déficit está relacionado con la pérdida de una parte de las IgG durante la etapa de fraccionamiento etanólico suplementario.

- 50 - de pureza: las relaciones IgG/proteínas totales obtenidas con los precipitados "II+III" puestos de nuevo en solución,

tratados por el ácido caprílico y ajustados a un pH de 4,6 son comparables con las obtenidas con los precipitados "I+II+III" vueltos a poner en solución, tratados por el ácido caprílico y ajustados a un pH de 4,8.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas a partir de una solución inicial de plasma sanguíneo o de fracción de plasma enriquecida en inmunoglobulinas, caracterizado por que comprende:
- 10 (a) una etapa de eliminación de los contaminantes proteicos por el ácido caprílico para obtener una solución desprovista de proteasas, en la que la concentración de ácido caprílico utilizada va del 0,5 al 1,5%, expresada en gramo de ácido caprílico por volumen de solución a tratar,
- (b) una etapa de clarificación a pH ácido por filtración en profundidad,
- (c) seguida de una etapa de cromatografía en lecho fluidizado de la solución desprovista de proteasas,
- 15 permitiendo dicho procedimiento obtener un concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas con un rendimiento superior a 4,5 g de inmunoglobulinas por litro de plasma sanguíneo utilizado.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la concentración de ácido caprílico utilizada va del 0,8 al 1,2%, expresada en gramo de ácido caprílico por volumen de solución a tratar.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que la concentración de ácido caprílico utilizada va del 0,9 al 1,1%, expresada en gramo de ácido caprílico por volumen de solución a tratar.
- 25 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la etapa de eliminación de los contaminantes proteicos por el ácido caprílico (a) se desarrolla a un pH comprendido entre 4,3 y 4,9, preferentemente entre 4,6 y 4,8.
- 30 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la etapa de cromatografía en lecho fluidizado de la solución desprovista de proteasas (c) se efectúa con un soporte cromatográfico de tipo intercambio de iones, de tipo afinidad, de tipo "pseudo-afinidad" o de tipo "modo-mixto".
- 35 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la etapa de cromatografía en lecho fluidizado de tipo "modo-mixto" comprende:
- cargar sobre una columna de cromatografía previamente equilibrada con un tampón a un pH comprendido entre 4,5 y 8 la solución que ha sufrido la etapa de clarificación por filtración en profundidad previamente ajustada al mismo pH,
- 40 - lavar dicha columna por una solución tampón hasta la eliminación de todas las proteínas no absorbidas sobre la columna,
- eluir las inmunoglobulinas polivalentes adsorbidas sobre la columna por un tampón de elución ajustado a pH comprendido entre 8 y 10, y
- 45 - recuperar la solución enriquecida en inmunoglobulinas polivalentes humanas.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además, después de la etapa (c), una o varias de las etapas siguientes:
- 50 (i) una etapa de inactivación viral,
- (ii) una etapa de cromatografía de intercambio de aniones de la solución obtenida al final de la etapa anterior,
- (iii) una etapa de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B de la solución obtenida al final de la etapa anterior,
- 55 (iv) una etapa de filtración a través de filtros nanométricos de porosidad decreciente de 100 a 15 nm,
- (v) una etapa de concentración por ultrafiltración de la solución procedente de la etapa anterior asociada a una etapa de formulación,
- 60 (vi) después una etapa de filtración esterilizante convencional.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la solución inicial es una fracción de plasma enriquecida en inmunoglobulinas por fraccionamiento etanólico y/o por separación cromatográfica.
- 65 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la solución inicial es un precipitado "I+II+III" o un precipitado

"II+III" obtenido a partir de plasma sanguíneo fraccionado con etanol, y puesto de nuevo en solución.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el precipitado "I+II+III" o el precipitado "II+III" se vuelve a poner en solución en agua purificada para inyección o en una solución que contiene iones.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la solución que contiene iones es una solución que comprende NaCl a una concentración inferior o igual a 20 mM, preferentemente comprendida entre 5 y 15 mM, y de manera preferida igual a 10 mM.

12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el precipitado "I+II+III" o el precipitado "II+III" se trata mediante una solución de CaCl<sub>2</sub> cuya concentración es inferior o igual a 20 mM, preferentemente comprendida entre 5 y 15 mM, y de manera preferida con una solución de CaCl<sub>2</sub> 10 mM.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende:

(i) una etapa de eliminación de contaminantes proteicos por el ácido caprílico,

(ii) una etapa de clarificación por filtración en profundidad,

(iii) una etapa de cromatografía en lecho fluidizado de tipo "modo-mixto",

(iv) una etapa de inactivación viral por tratamiento disolvente/detergente,

(v) una etapa de cromatografía de intercambio de aniones,

(vi) una etapa de eliminación de los anticuerpos anti-A y anti-B,

(vii) una filtración a través de filtros nanométricos de porosidad decreciente de 100 a 15 nm,

(viii) una etapa de concentración por ultrafiltración de la solución procedente de la etapa anterior asociada a una etapa de formulación, después una etapa de filtración esterilizante convencional.

14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además las etapas siguientes:

(a) añadir al concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas obtenido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, uno o varios estabilizantes farmacéuticamente aceptables, y

(b) opcionalmente, congelar o liofilizar la preparación farmacéutica obtenida en la etapa anterior;

de manera que dicha preparación farmacéutica esté en forma líquida, congelada o liofilizada.

15. Concentrado de inmunoglobulinas polivalentes humanas obtenido según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que dicho concentrado posee una actividad anti-complementaria inferior al 30%.

16. Composición farmacéutica de inmunoglobulinas polivalentes humanas líquida, congelada o liofilizada obtenida según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para una utilización en el tratamiento de patologías comprendidas en el grupo que consiste en las polineuropatías desmielinizantes, la esclerosis múltiple, el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, los dermatomiositis, un tratamiento sustitutivo en el caso de deficiencias inmunitarias primitivas tales como las agammaglobulinemias congénitas y las hipogammaglobulinemias congénitas, la deficiencia inmunitaria común variable, la deficiencia inmunitaria combinada severa, el síndrome de Wiskott Aldrich, el mieloma o la leucemia linfocítica crónica con hipogammaglobulinemia secundaria severa e infecciones recurrentes, las infecciones recurrentes en el niño infectado por VIH, el tratamiento de deficiencias inmunitarias primitivas con hipogammaglobulinemia o padecimiento funcional de la inmunidad humoral, el tratamiento de deficiencias inmunitarias secundarias de la inmunidad humoral, en particular la leucemia linfocítica crónica o el mieloma con hipogammaglobulinemia y asociados a infecciones de repetición, el aloinjerto de células madre hematopoyéticas con hipogammaglobulinemia asociada a una infección, el tratamiento inmunomodulador de púrpura trombopénica idiopática (PTI) en el adulto y el niño en caso de riesgo hemorrágico importante o antes una operación médica o quirúrgica, de la retinocoroiditis de Birdshot, del síndrome de Guillain-Barré, de la neuropatía motriz multifocal (NMM), de los poliradiculoneuritis inflamatorias desmielinizantes crónicas (PIDC), y de la enfermedad de Kawasaki.