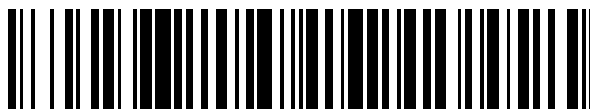


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 153**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/06**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2015** **PCT/GB2015/052144**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2016** **WO16012803**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2015** **E 15744309 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018** **EP 3071596**

54 Título: **Proceso mejorado para la preparación de inmunoglobulina G (IGG)**

30 Prioridad:

**25.07.2014 GB 201413227**

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

**31.10.2018**

73 Titular/es:

**BIO PRODUCTS LABORATORY LIMITED (100.0%)**  
**Dagger Lane, Elstree**  
**Hertfordshire WD6 3BX, GB**

72 Inventor/es:

**MORE, JOHN y**  
**DOLAN, TARA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 688 153 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

Proceso mejorado para la preparación de inmunoglobulina G (IgG)

5 La presente invención se refiere a procesos mejorados para la preparación de inmunoglobulina G (IgG).

## Antecedentes

10 La inmunoglobulina G (IgG) es un isotipo de anticuerpo abundante en el ser humano. La IgG se une a muchos tipos diferentes de patógenos, incluidos virus, bacterias y hongos, para proteger al cuerpo de infecciones. Por lo tanto, la IgG juega un papel clave en la función del sistema inmunitario. Hay cuatro subclases de IgG en los seres humanos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgG1 e IgG2 son los tipos más comunes de IgG, que representan casi el 90 % de todas las IgG. Para facilitar la referencia, en la presente memoria, donde se hace referencia a IgG, se pretende abarcar los cuatro tipos, así como cualquier combinación de los mismos. El término "IgG" pretende abarcar además IgIV  
15 (inmunoglobulina intravenosa), IGSC (inmunoglobulina subcutánea) e IGIM (inmunoglobulina intramuscular).

Como se señaló anteriormente, la IgG juega un papel clave en la función del sistema inmunitario. Se ha encontrado que los pacientes con trastornos inmunitarios y autoinmunitarios pueden beneficiarse del tratamiento con IgG. Las afecciones que pueden tratarse con IgG incluyen inmunodeficiencia primaria (PID), que incluye inmunodeficiencia combinada grave (SCID) e inmunodeficiencia variable común (CVID) e inmunodeficiencias secundarias (SID) resultantes de otras enfermedades, como leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple o SIDA pediátrico o después de un trasplante de médula ósea. Otras afecciones que pueden tratarse incluyen la púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), la enfermedad de Kawasaki, el lupus eritematoso sistémico (LES), la miastenia grave, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC) y la neuropatía motora multifocal (MMN). La IgG también  
20 se usa en el tratamiento de muchas otras afecciones reumatológicas, hematológicas y dermatológicas.

La IgG normalmente se aísla del plasma sanguíneo humano combinado usando procesos de fraccionamiento convencionales. Cohn desarrolló un proceso de fraccionamiento de etanol en frío a principios de la década de 1940 para purificar la albúmina de la sangre humana (Cohn, E.J. et al., J. Am. Chem. Soc., 68: 459-475, (1946)). Esto también se conoce como 'Método 6 de Cohn'.  
30

Este proceso se basa en la solubilidad diferencial de las proteínas deseadas en función del pH, la concentración de etanol, la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de proteína. Durante el proceso de Cohn, la concentración de etanol aumenta hasta 40 %, el pH disminuye desde neutro hasta 4,8 y la temperatura disminuye desde temperatura ambiente hasta -5 °C en el transcurso del fraccionamiento. A medida que las condiciones cambian durante el proceso, las diferentes proteínas plasmáticas se precipitan secuencialmente, y otras proteínas permanecen en solución. Dependiendo de la proteína o proteínas exactas de interés, tanto el precipitado como el sobrenadante de cada etapa de fraccionamiento pueden procesarse adicionalmente. Hay cinco fracciones principales de precipitado de Cohn, fracciones I a V, comprendiendo cada fracción una proteína diferente como su componente principal. Por ejemplo, la albúmina se obtiene de la fracción V, mientras que la IgG se puede obtener de la fracción II+III. Posteriormente, se desarrolló un método para fraccionamiento adicional de la Fracción II+III de Cohn (un intermedio del Método 6 de Cohn) en la Fracción II (una fracción de precipitado de IgG más purificada) que se denomina "Método 9 de Oncley" (Oncley, J.L. et al., J. Am. Chem. Soc., 71, 541-550, (1949)).  
40

Hay muchas variaciones en el proceso de Cohn, incluidos los métodos de Gerlough, Hink y Mulford. El método de Kistler y Nitschmann es otra variante conocida (P. Kistler y Hs. Nitschmann, Vox Sang. 7: 414-424 (1962)). En este método, los precipitados A a C reemplazan las fracciones II+III, III y V de Cohn respectivamente. Este proceso ha sido ampliamente aceptado porque implica menos etapas en general que el método de Cohn, con los beneficios añadidos de un procesamiento más rápido y un menor uso de etanol.  
45

Otros métodos para purificar IgG incluyen el aislamiento directo de IgG del plasma o plasma intermedio II+III del Método 6 de Cohn mediante cromatografía de intercambio iónico y precipitación con polietilenglicol. Los rendimientos de los procesos pueden ser relativamente altos. Algunos de estos métodos han sido abandonados debido a objeciones en cuanto a la pureza y en particular la transmisión de virus transmitidos por la sangre como la hepatitis y el VIH. Sin embargo, la introducción de etapas específicas de inactivación de virus ha llevado a una inversión sustancial en procesos cromatográficos en los últimos años, aunque la complejidad, los altos costos de capital y los altos requisitos de tratamiento de aguas/desechos han limitado esta opción a todos los fraccionadores de plasma más grandes y menos financiados.  
50

El proceso de Cohn (y variantes del mismo) produce IgG sustancialmente monomérica. Con esto se quiere decir que la mayoría del producto de IgG es monomérico, con menos del 20 % de IgG en forma de dímeros y agregados más grandes. En general, la presencia de agregados de IgG es indeseable, ya que se ha relacionado con respuestas inmunitarias no deseadas en pacientes que reciben IgG derivada del plasma. Por lo tanto, es deseable que el producto de IgG obtenido mediante cualquier proceso de purificación contenga tanto monómero como sea posible.  
55

60

La demanda de IgG se duplicó con creces entre 1998 y 2006, y la demanda continúa creciendo. En 2008, el mercado mundial de fracciones de plasma se estimó en 12 mil millones de dólares, de los cuales casi la mitad eran IgG. En la actualidad, el suministro debe provenir del plasma donado por donantes humanos. Como hay un suministro finito de plasma, existe en consecuencia una necesidad en la técnica de procedimientos mejorados para aislar IgG que tengan un rendimiento mejorado. Sin embargo, para todas las aplicaciones clínicas, es importante tener IgG altamente pura con el fin de minimizar cualquier efecto secundario indeseable que resulte, por ejemplo, de la presencia de otras proteasas o factores de coagulación u otros componentes contaminantes, tales como los virus transmitidos por la sangre.

J. A. Hooper, en *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 28 (2008) 765-778 y Andrea Buchacher y Waltrud Kaar en el Capítulo 13 de *Producción de proteínas plasmáticas para uso terapéutico* (John Wiley & Sons, Inc., 2013, Editores Joseph Bertolini, Neil Goss y John Curling) describen diversos procesos para preparar formulaciones comerciales de IgG. La mayoría de los productos de IgG autorizados para su uso se producen por fraccionamiento en etanol frío (es decir, el proceso de Cohn/Oncley o una variante del mismo) seguido de purificación usando cromatografía de intercambio iónico. Las pérdidas de IgG se minimizan mediante el uso de I + II + III (o II+III si el fibrinógeno se precipita antes en la fracción I) como material de partida para la cromatografía de intercambio iónico ya que la principal pérdida de IgG ocurre en la etapa subsiguiente de la Fracción III (Precipitado B) del proceso de fraccionamiento de Cohn/Oncley (Kistler & Nitschmann).

Es inherente a cualquier esquema de purificación de proteínas que la proteína diana se separe de cualquier proteína no deseada y cualquier otra materia no deseada que luego se considere superflua para el proceso. Tal otra materia puede comprender otros restos químicos que incluyen sustancias peligrosas o patógenas que son indeseables en el producto objetivo. Por lo tanto, los procesos de purificación de proteínas generalmente producen una "fracción de producto" que contiene la proteína o proteínas de interés y las llamadas fracciones "residuales" o "secundarias". Sin embargo, tales clasificaciones desdeñosas pueden ser engañosas porque estas llamadas "fracciones residuales" pueden, no obstante, tener valor como materiales fuente para otras proteínas o sustancias componentes.

En el campo de las proteínas plasmáticas, la evidencia de esta nomenclatura engañosa se encuentra en el documento AU715427B2, que describe el uso de "fracciones residuales" como materia prima para la purificación de inmunoglobulinas específicas mediante cromatografía de afinidad. Igualmente, el documento JPS601134A describe el uso de fracciones residuales como materia prima para la purificación de inmunoglobulinas mediante electroforesis en gradiente. El documento WO2010/132686A1 describe el uso de una fracción descartada del fraccionamiento de IgG para purificar las inmunoglobulinas agregadas que están presentes en esa fracción.

El documento UA45557U demuestra un uso alternativo del término "fracción residual" al describir un proceso de fraccionamiento de plasma normal que se aplica a las donaciones de plasma que han sido rechazadas como "desechos" debido a la contaminación con marcadores del patógeno de la hepatitis C.

Queda el problema sin resolver de que los rendimientos de IgG en el proceso de Cohn/Oncley y sus variantes (en lo sucesivo, la corriente del proceso principal) son menores que la cantidad total de IgG presente en el plasma. Esto puede reflejar cierta desnaturalización de la proteína durante el proceso de fabricación. Adicional o alternativamente, pequeñas cantidades residuales de inmunoglobulina de alta calidad (es decir, IgG no agregada, predominantemente monomérica) pueden separarse de la vía de fraccionamiento de fabricación principal por atrapamiento en fracciones "residuales" separadas y eliminadas que también contienen otros componentes incluyendo multímeros y agregados de IgG. Esto compromete la recuperación eficiente de valiosas inmunoglobulinas del escaso material de partida del plasma, con el consiguiente impacto en la disponibilidad del producto terapéutico en beneficio de los pacientes.

En el contexto de esta solicitud, el término "fracción residual" se define como una fracción que está separada de la "fracción de producto principal" deseada. La fracción del producto generalmente contendrá la proteína diana deseada con alta pureza. La llamada fracción residual contendrá algo de la proteína diana, aunque en combinación con otros componentes que pueden comprometer la calidad, eficacia o seguridad de la proteína diana. De hecho, la fracción residual puede ser valiosa como fuente de proteínas distintas a la proteína diana. En esta solicitud, la proteína diana es la inmunoglobulina IgG.

Por lo tanto, en la purificación de plasma para extraer IgG, la corriente del proceso principal es la que conduce al producto de IgG. Si el proceso principal es un proceso de fraccionamiento de Cohn, entonces la fracción principal del producto es la fracción II de Cohn. En un proceso de fraccionamiento de Cohn para producir IgG, el sobrenadante A+I se consideraría como "residual" ya que no contiene una cantidad significativa de IgG. Sin embargo, como se demuestra en la Fig. 1, dicho producto residual puede purificarse adicionalmente para producir otras proteínas diana. Por ejemplo, el sobrenadante A+I puede procesarse adicionalmente para producir la Fracción V de Cohn, que contiene albúmina. Por lo tanto, el sobrenadante A+I es solo una "fracción residual" cuando la proteína primaria de interés del proceso de fraccionamiento del plasma no es albúmina.

Se ha observado que las fracciones residuales generadas durante el proceso de Cohn/Oncley (y sus variantes) pueden contener cantidades significativas de IgG. Se ha demostrado que las fracciones residuales pueden contener hasta el 30 % de la cantidad total de IgG en el plasma inicial.

- 5 Sería ventajoso proporcionar procedimientos mejorados para producir IgG que puedan tener rendimientos más altos que los procesos actualmente disponibles mientras se mantienen altos niveles de pureza y seguridad, y que no requieran etapas de cromatografía complejas y costosas adicionales.

#### Sumario de la invención

- 10 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que la IgG de alta pureza (por ejemplo, que cumple con la monografía de la Farmacopea Europea 0338 para inmunoglobulina normal que comprende no menos de 85 % en peso de monómero y dímero y no más de 10 % en peso de polímero y/o agregado) se puede obtener de manera relativamente fácil a partir de fracciones de precipitado que se consideraron previamente como fracciones  
15 "residuales" durante los procesos de fraccionamiento del plasma para producir IgG, sin la necesidad de etapas de cromatografía, y particularmente sin la necesidad de etapas de cromatografía de afinidad o intercambio aniónico. Mediante la extracción de IgG de tales fracciones residuales, el rendimiento global de IgG puede aumentarse significativamente, sin la necesidad de etapas de purificación posteriores adicionales.

- 20 La presente invención, por lo tanto, proporciona el uso de una fracción de precipitado residual producida durante el fraccionamiento del plasma como fuente de IgG. Preferiblemente, la fracción de precipitado residual se produce durante una etapa de fraccionamiento para producir una fracción líquida (sobrenadante) que contiene IgG.

- 25 Más específicamente, la invención proporciona un método para extraer IgG de una fracción de precipitado residual producida durante el fraccionamiento del plasma y separada de la corriente principal del proceso de fabricación de IgG, comprendiendo el método poner en contacto el precipitado residual con un disolvente adecuado para extraer IgG del precipitado residual. Preferiblemente, la fracción de precipitado residual se produce durante una etapa de fraccionamiento para producir una fracción líquida (sobrenadante) que contiene IgG. En particular, el método de la invención no requiere ninguna etapa de cromatografía, tal como cromatografía de afinidad o cromatografía de  
30 intercambio aniónico, y ningún proceso eléctrico, tal como electroforesis, para la separación de la IgG de una fracción de precipitado residual producida durante el fraccionamiento del plasma.

- En otro aspecto, la invención proporciona un método para mejorar el rendimiento de IgG durante el fraccionamiento del plasma para producir IgG, comprendiendo el método extraer IgG de una fracción de precipitado residual que se  
35 produce durante el fraccionamiento del plasma y separada de la corriente principal de procesamiento de fabricación de IgG usando un disolvente adecuado. Preferiblemente, la fracción de precipitado residual se produce durante una etapa de fraccionamiento para producir una fracción líquida (sobrenadante) que contiene IgG.

- 40 En otro aspecto, la invención proporciona un método para la separación de IgG del plasma o una fracción de plasma, comprendiendo el proceso

- a) fraccionar el plasma o la fracción de plasma para producir una fracción líquida que contiene la mayoría de la IgG en el plasma o una fracción de plasma, y una fracción de precipitado residual que contiene IgG adicional; y  
45 b) extraer al menos parte de la IgG adicional de la fracción de precipitado residual usando un disolvente adecuado.

En un aspecto preferido, la invención proporciona un método para la preparación de IgG que comprende:

- 50 a) recuperar el precipitado y el sobrenadante de un proceso de fraccionamiento de Kistler y Nitschmann B+I modificado;  
b) homogeneizar el precipitado obtenido en la etapa a) y extraer la IgG de la misma mezclando con 17 % en volumen de etanol en tampón acuoso de acetato/fosfato a 0 °C durante 1 a 3 horas; y después  
c) separar el tampón que contiene IgG extraída de cualquier precipitado restante.

- 55 Más preferiblemente, el método anterior comprende además combinar el tampón que contiene la IgG extraída obtenida en la etapa c) con el sobrenadante B+1 modificado de Kistler y Nitschmann obtenido en la etapa a). En otra alternativa, en el método descrito anteriormente, la etapa c) se realiza mediante filtración y el método comprende además incubar la IgG extraída en etanol acuoso de acuerdo con las condiciones para la precipitación de la Fracción II de Kistler y Nitschmann; y recuperar el precipitado de la Fracción II enriquecido con la IgG resultante.

- 60 En todos los aspectos de la invención, la fracción de precipitado residual es preferiblemente sustancialmente equivalente a la fracción III de Cohn. Más preferiblemente, es la fracción III o I+III de Cohn, el precipitado B o B+I de Kistler & Nitschmann o el precipitado B o B+I modificado de Kistler & Nitschmann.

En todos los aspectos de la invención, la fracción líquida es preferiblemente sustancialmente equivalente al sobrenadante III de Cohn. Más preferiblemente, es el sobrenadante III o I+III de Cohn, o el sobrenadante B o B+I de Kistler & Nitschmann, o el sobrenadante B o B+I modificado de Kistler & Nitschmann. Lo más preferiblemente, la fracción líquida se puede reintroducir en el sobrenadante III o I+III de Cohn de la corriente principal o en el sobrenadante B o B+I modificado de Kistler & Nitschmann para el procesamiento corriente abajo de la IgG. También puede procesarse en adelante como una subfracción separada y reintroducirse en el procesamiento de la corriente principal en la Fracción II o después de un posterior procesamiento posterior en cualquier etapa posterior adecuada. Como alternativa, la fracción líquida podría procesarse de manera completamente independiente a través de un producto de IgG humana purificada.

Cualquier referencia en la presente memoria a un proceso modificado de Kistler & Nitschmann se refiere a un proceso como el descrito en Roberts et. al., *Biologicals*, vol. 43 (2), marzo de 2015, p123-129.

#### Breve descripción de las Figuras

La Figura 1 es un esquema de un proceso de fraccionamiento en etanol frío de Kistler & Nitschmann modificado que puede usarse para la producción de IgG humana y albúmina.

La Figura 2 es un esquema que muestra cómo un proceso de la invención puede integrarse en un proceso de fraccionamiento en etanol frío de Kistler & Nitschmann modificado.

La Figura 3 es un esquema que muestra un proceso de fraccionamiento en etanol frío de Kistler & Nitschmann modificado para la producción de IgG.

La Figura 4 es un esquema que muestra el proceso de fraccionamiento en etanol frío de Kistler & Nitschmann modificado de la Figura 3 que incorpora una etapa de lavado de la fracción B+I adicional de la presente invención, con etapas alternativas para la reintroducción de la IgG recuperada adicional en la corriente del proceso.

La Figura 5 es un esquema que muestra un proceso de fraccionamiento de Cohn/Oncley con una etapa de lavado de la fracción III/I+III adicional de la presente invención, con etapas alternativas para la reintroducción de la IgG recuperada adicional en la corriente del proceso.

#### Descripción detallada

A continuación, la expresión "fracción líquida" y el término "sobrenadante" son equivalentes, como lo son los términos "precipitado" y "fracción".

Los productos de IgG obtenidos en los métodos descritos en la presente memoria son de alta pureza, con una cantidad mínima de IgG agregada y, por lo tanto, cumplen los estándares mínimos de pureza establecidos en la monografía de la Farmacopea Europea 0338 (01/2015). Por lo tanto, los productos de IgG obtenidos directamente por los métodos descritos en la presente memoria contienen al menos un 90 % de gammaglobulina, según se determina mediante electroforesis. El producto obtenido por estos métodos también contiene al menos 85 % en peso de IgG monomérica y dimérica, con menos de 10 % en peso de IgG polimérica y agregada, según se determina mediante cromatografía de exclusión molecular. La HPLC también se puede usar para analizar el contenido agregado. Esto significa que los productos obtenidos a partir de los procesos de fraccionamiento descritos en la presente memoria son de suficiente pureza y calidad para cumplir los estándares de la farmacopea europea, y por lo tanto no requieren necesariamente ninguna purificación adicional para producir un producto farmacéutico. Por supuesto, la IgG obtenida por los procesos de fraccionamiento descritos en la presente memoria puede procesarse adicionalmente por cualquier medio adecuado para obtener un producto de IgG de mayor calidad, o para obtener un perfil de producto diferente, p.ej., para un uso farmacéutico alternativo. Tales métodos de procesamiento adicionales son bien conocidos por los expertos en la técnica, y pueden incluir en particular una o más etapas de inactivación de virus.

El fraccionamiento en etanol frío es uno de los métodos más ampliamente utilizados para aislar IgG del plasma sanguíneo. Generalmente, un lote combinado de plasma de múltiples donantes se somete a crioprecipitación para eliminar factores de coagulación tales como el Factor VIII como crioprecipitado. El sobrenadante de crioprecipitado se somete después a una o más etapas de fraccionamiento en etanol frío para producir eventualmente una fracción de precipitado que comprende principalmente IgG. Tanto en el proceso clásico de Cohn/Oncley como en el método de Kistler & Nitschmann, esta fracción rica en IgG se denomina Fracción II o precipitado II. Este precipitado se somete después a purificación adicional y a etapas de inactivación de virus para proporcionar un producto final de IgG farmacéuticamente aceptable, para infusión intravenosa, subcutánea o intramuscular.

“Plasma normal”, “plasma hiperinmunitario” (tal como plasma hiperinmunitario anti-D, tétanos o hepatitis B) o cualquier equivalente en plasma del mismo se pueden usar en los procesos de fraccionamiento en etanol frío descritos en la presente memoria.

En el método de fraccionamiento de Cohn, la primera etapa de fraccionamiento da como resultado la fracción I que comprende principalmente fibrinógeno y fibronectina. El sobrenadante de esta etapa se procesa adicionalmente para precipitar la fracción II+III y luego las fracciones III y II. Generalmente, la fracción II+III contiene aproximadamente 60 % de IgG, junto con impurezas tales como fibrinógeno, IgM e IgA. La mayoría de estas impurezas se eliminan en la fracción III, que se considera una fracción residual y normalmente se descarta. El sobrenadante se trata después para precipitar la fracción principal que contiene IgG, fracción II, que puede contener más de 90 % de IgG. Los valores en % anteriores se refieren al % de pureza de la IgG. La pureza se puede medir mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como electroforesis en gel.

En el método de Kistler & Nitschmann, la fracción I es equivalente a la fracción I del método de Cohn. El siguiente precipitado/fracción se denomina precipitado A (fracción A). Este precipitado es ampliamente equivalente, aunque no idéntico, a la fracción II+III de Cohn. El precipitado se redisuelve a continuación y las condiciones se ajustan para precipitar el precipitado B (fracción B), que es equivalente a la fracción III de Cohn. De nuevo, esto se considera una fracción residual y normalmente se descarta. El sobrenadante B precipitado se procesa adicionalmente para producir el precipitado II, que corresponde a la Fracción II de Cohn.

En una modificación del proceso de Kistler & Nitschmann, que se muestra en la Figura 1, es posible combinar las dos primeras etapas de fraccionamiento de modo que la fracción I no se recupere y el primer precipitado, denominado A+I, incluya fibrinógeno y fibronectina. Cuando este precipitado se resuspende y se somete a una etapa de precipitación adicional, el precipitado formado, que se puede denominar B+I, contiene fibrinógeno y fibronectina, así como otras impurezas que incluyen IgM e IgA. El sobrenadante de esta etapa de precipitación se procesa adicionalmente para producir la fracción rica en IgG, Fracción II. El precipitado B+I en este proceso también se considera una fracción residual en lo que respecta a la corriente del proceso de IgG.

En principio, los métodos de la presente invención se pueden aplicar a cualquiera de las fracciones de precipitado producidas durante el fraccionamiento en etanol frío antes de la producción de la fracción II, incluyendo la fracción III y fracción I+III de Cohn y el precipitado B o B+I de Kistler & Nitschmann. Preferiblemente, los métodos se aplican a la fracción de precipitado inmediatamente anterior a la fracción II en el proceso de fraccionamiento, que normalmente se considera una fracción residual. Preferiblemente, la fracción de precipitado residual es la fracción III o I+III de Cohn, el precipitado B o B+I de Kistler & Nitschmann, un precipitado B o B+I modificado de Kistler & Nitschmann, o una fracción que es sustancialmente equivalente a la misma.

Se ha encontrado que estas fracciones de precipitados residuales pueden contener cantidades significativas de IgG del conjunto de plasma de partida, en algunos casos hasta el 25-30 %. Se postula que esto se debe en parte a que parte del sobrenadante está atrapado en la fracción de precipitado y en parte debido a la coprecipitación de IgG con impurezas tales como IgM e IgA.

Sorprendentemente, se ha descubierto que es posible recuperar una proporción comercialmente significativa de la IgG “perdida” en forma relativamente pura mediante un proceso simple de lavado (extracción) aplicado a la fracción residual. Este resultado es inesperado, ya que una persona experta habría esperado que la extracción de IgG del precipitado residual fuese difícil dados los niveles relativamente altos de otras proteínas presentes en el precipitado, y que cualquier IgG que pudiera extraerse fuera de baja pureza (p.ej., en términos de agregación y otras especies de proteínas no deseadas o actividad proteolítica).

Es importante observar que el método de la presente invención no requiere ninguna etapa cromatográfica para extraer más IgG de la fracción residual. Por lo tanto, el proceso de la presente invención proporciona un producto de IgG relativamente puro a partir de fracciones residuales sin necesidad de cromatografía.

Se ha observado que la elección de un disolvente adecuado para el proceso de lavado permite la extracción de IgG del precipitado residual sin una extracción significativa de ninguna de las otras proteínas presentes en el precipitado, que se consideran impurezas en lo que respecta a la purificación de IgG. Por lo tanto, el disolvente debe seleccionarse para que sea específico para la eliminación de IgG del precipitado, sin eliminar simultáneamente las impurezas no deseadas del precipitado.

La fracción de precipitado residual puede someterse a un proceso de lavado inmediatamente después de que se produce. Como alternativa, la fracción residual puede almacenarse en forma congelada para su posterior procesamiento. Antes del lavado, el precipitado debe, si es necesario, equilibrarse a la temperatura a la que se llevará a cabo el proceso de lavado. Tal equilibrio generalmente será estático, es decir, no implicará ninguna agitación del precipitado.

El tipo y la cantidad de disolvente utilizado para el proceso de lavado deben seleccionarse de modo que la recuperación de IgG se maximice sin comprometer indebidamente la pureza de la IgG recuperada. Para optimizar la recuperación de IgG mientras se minimiza la extracción de impurezas del precipitado residual, el disolvente utilizado para el lavado/extracción es preferiblemente idéntico al disolvente usado en la etapa de fraccionamiento que produjo el precipitado residual en cuestión.

Cuando la fracción residual es el precipitado B o B+I (modificado) de Kistler & Nitschmann, o la fracción III o I+III de Cohn, los disolventes preferidos son soluciones acuosas de etanol. Más preferiblemente, tales soluciones de etanol están tamponadas. La concentración de etanol, la temperatura y el pH deben controlarse de modo que la IgG extraída del precipitado permanezca en solución.

Las concentraciones preferidas de etanol están en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 % en volumen. Más preferido es un intervalo de concentración de aproximadamente 11 a aproximadamente 19 % en volumen, incluso más preferida es un intervalo de concentración de aproximadamente 12 a aproximadamente 19 % en volumen, lo más preferiblemente un intervalo de concentración de aproximadamente 13 a aproximadamente 17 % en volumen. Aproximadamente 13 % en volumen y aproximadamente 17 % en volumen son los más preferidos. "Aproximadamente 13 % en volumen" es preferiblemente  $13 \pm 2$  % en volumen, mientras que "aproximadamente 17 % en volumen" es preferiblemente  $17 \pm 2$  % en volumen.

La temperatura a la que se produce el proceso de lavado también afectará a la cantidad y pureza de la IgG recuperada. Idealmente, la temperatura durante el proceso de lavado se mantiene a la misma temperatura que se usó para la etapa de fraccionamiento que produjo el precipitado residual en cuestión. El intervalo de temperatura óptimo por lo tanto dependerá de la fracción y del proceso de fraccionamiento en cuestión. Generalmente se prefieren temperaturas en el intervalo de aproximadamente  $-3^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $-8^{\circ}\text{C}$ , que incluyen aproximadamente  $-3^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $-7^{\circ}\text{C}$ . Por ejemplo, cuando la fracción residual es el precipitado B o B+I (modificado) de Kistler & Nitschmann, la temperatura durante la extracción del lavado es preferiblemente  $-5^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ . Cuando la fracción residual es la fracción III o I+III de Cohn, la temperatura preferida suele ser ligeramente más fría, preferiblemente  $-6^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ .

Generalmente se prefieren temperaturas en el intervalo de aproximadamente  $+3^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $-8^{\circ}\text{C}$ , que incluyen aproximadamente  $-3^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $-7^{\circ}\text{C}$ . Por ejemplo, cuando la fracción residual es el precipitado B o B+I modificado de Kistler & Nitschmann, la temperatura durante la extracción del lavado es preferiblemente de  $-2^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Cuando la fracción residual es la fracción III o I+III de Cohn, la temperatura preferida suele ser ligeramente más fría, preferiblemente  $-3^{\circ}\text{C} \pm 5,0^{\circ}\text{C}$ .

El intervalo de pH óptimo también dependerá de la fracción. Generalmente se prefieren pH en el intervalo de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,3, más preferiblemente de aproximadamente 5,1 a aproximadamente 5,3. Por ejemplo, cuando la fracción residual es el precipitado B o B+I (modificado) de Kistler & Nitschmann, el intervalo de pH es preferiblemente de  $5,1 \pm 0,05$ . Cuando la fracción residual es la fracción III o I+III de Cohn, el pH puede ser ligeramente mayor, preferiblemente de  $5,2 \pm 0,05$ .

En una realización particularmente preferida, cuando la fracción residual es el precipitado B o B+I (modificado) de Kistler & Nitschmann, el disolvente es  $17 \pm 2$  % en volumen de etanol acuoso, la temperatura es  $-5^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  y el intervalo de pH es  $5,1 \pm 0,05$ .

En una realización particularmente preferida, cuando la fracción residual es el precipitado B o B+I (modificado) de Kistler & Nitschmann, el disolvente es  $17 \pm 2$  % en volumen de etanol acuoso, la temperatura es  $-2^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  y el intervalo de pH es  $5,1 \pm 0,05$ .

En otra realización particularmente preferida, cuando la fracción residual es la fracción III o I+III de Cohn, el disolvente es etanol acuoso al  $17 \pm 2$  % en volumen, la temperatura es  $-6^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  y el intervalo de pH es  $5,2 \pm 0,05$ .

En otra realización particularmente preferida, cuando la fracción residual es la fracción III o I+III de Cohn, el disolvente es etanol acuoso al  $17 \pm 2$  % en volumen, la temperatura es  $-3^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  y el intervalo de pH es  $5,2 \pm 0,05$ .

En otra realización particularmente preferida, cuando la fracción residual es el precipitado B o B+I (modificado) de Kistler & Nitschmann preparado a partir de plasma hiperinmunitario, o plasma equivalente, el disolvente es  $13 \pm 2$  % en volumen de etanol acuoso, la temperatura es  $-5^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$  y el intervalo de pH es  $5,1 \pm 0,05$ .

En otra realización particularmente preferida, cuando la fracción residual es el precipitado B o B+I (modificado) de Kistler & Nitschmann preparado a partir de plasma hiperinmunitario, o plasma equivalente, el disolvente es  $13 \pm 2$  % en volumen de etanol acuoso, la temperatura es  $-2^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  y el intervalo de pH es  $5,1 \pm 0,05$ .

En otra realización particularmente preferida, cuando la fracción residual es la fracción III o I+III de Cohn preparada a partir de plasma hiperinmunitario, o plasma equivalente, el disolvente es  $13 \pm 2 \%$  en volumen de etanol acuoso, la temperatura es  $-6^\circ\text{C} \pm 2,0^\circ\text{C}$  y el intervalo de pH es  $5,2 \pm 0,05$ .

- 5 En otra realización particularmente preferida, cuando la fracción residual es la fracción III o I+III de Cohn preparada a partir de plasma hiperinmunitario, o plasma equivalente, el disolvente es  $13 \pm 2 \%$  en volumen de etanol acuoso, la temperatura es  $-3^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$  y el intervalo de pH es  $5,2 \pm 0,05$ .

El disolvente puede estar tamponado usando tampones conocidos, incluyendo fosfato y acetato.

- 10 Generalmente, la etapa de lavado comprende la suspensión de la fracción residual en el disolvente. La suspensión se mezcla, idealmente hasta que se homogeneiza, y luego se deja durante un período de tiempo suficiente para extraer la IgG en el disolvente. Esto corresponde a las etapas de "extracción" y "acondicionamiento" que se muestran en las Figuras 2, 4 y 5. No hay un límite de tiempo máximo específico para esta etapa de  
15 suspensión/acondicionamiento/extracción. El tiempo empleado en la práctica estará limitado por factores externos, como la eficiencia del proceso. Por esta razón, el tiempo de extracción es preferiblemente entre 1 y 24 horas, por ejemplo entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 horas. Un período de aproximadamente 2 horas, p.ej., 90-150 minutos, también pueden ser adecuados.

- 20 En un aspecto preferido, la invención proporciona un método para la preparación de IgG que comprende:

- a) recuperar el precipitado y el sobrenadante de un proceso de fraccionamiento de Kistler y Nitschmann B+I modificado;
- b) homogeneizar el precipitado obtenido en la etapa a) y extraer la IgG del mismo mezclando con  $17 \%$  en  
25 volumen de etanol acuoso en tampón de acetato/fosfato a  $0^\circ\text{C}$  durante 1 a 3 horas; y después
- c) separar el tampón que contiene la IgG extraída de cualquier precipitado restante.

- Más preferiblemente, el método anterior comprende además combinar el tampón que contiene la IgG extraída obtenida en la etapa c) con el sobrenadante B+I modificado de Kistler y Nitschmann obtenido en la etapa a). En otra  
30 alternativa, en el método descrito anteriormente, la etapa c) se realiza mediante filtración y el método comprende además incubar la IgG extraída en etanol acuoso de acuerdo con las condiciones para la precipitación de la Fracción modificada de Kistler y Nitschmann; y recuperar el precipitado de la Fracción II enriquecido con IgG resultante.

- La solución rica en IgG producida en la etapa de lavado/extracción preferiblemente contiene IgG de pureza igual o  
35 similar al sobrenadante que contiene IgG principal producido cuando la fracción residual se precipitó y/o se separó de la corriente del proceso de fabricación de proteína diana IgG establecida.

- Dado el valor comercial y terapéutico de la IgG, cualquier mejora en el rendimiento de IgG a partir del plasma de  
40 partida es potencialmente importante, e incluso un porcentaje relativamente bajo de IgG de una fracción residual puede ser muy valioso.

- La solución enriquecida en IgG resultante se puede recuperar mediante cualquier método estándar conocido en la técnica, por ejemplo, centrifugación o filtración para separarlo del precipitado restante. Si se usa la centrifugación, el  
45 sobrenadante será rico en IgG (es decir, contendrá la IgG extraída), y el precipitado puede descartarse, tratarse de nuevo según la invención para extraer IgG adicional y/o usarse para la extracción de otras proteínas. Si se usa la filtración, el filtrado será rico en IgG, y la torta de filtración resultante puede desecharse, enjuagarse adicionalmente para recuperar la IgG residual retenida, tratarse de nuevo según la invención para extraer IgG adicional y/o usarse para la extracción de otras proteínas. Los medios filtrantes adecuados son conocidos en la técnica. Se puede añadir un auxiliar de la filtración de silicato, como tierra de diatomea, por ejemplo Celite® o Celpure®, para facilitar la  
50 filtración.

- Cualquier volumen de disolvente puede usarse potencialmente en el proceso de lavado, pero idealmente debe optimizarse para el equipo de procesamiento disponible. Si se usan volúmenes muy bajos, la suspensión resultante puede ser demasiado viscosa para procesarla fácilmente, mientras que volúmenes muy altos pueden conducir a  
55 ineficiencias en el proceso. Por razones de eficacia del proceso, por lo tanto, generalmente se prefiere mantener el volumen de disolvente relativamente bajo. Por ejemplo, el peso de la fracción residual respecto al disolvente generalmente será de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10. Preferiblemente, el peso del disolvente puede ser aproximadamente cuatro veces el peso de la fracción residual, es decir, una relación en peso de aproximadamente 1:4 de la fracción residual respecto al disolvente.

- 60 Las soluciones ricas en IgG obtenidas usando los procesos de la invención se pueden procesar adicionalmente mediante métodos conocidos en la técnica para proporcionar un producto de IgG farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con los estándares establecidos tanto por la Farmacopea de los Estados Unidos como por la Farmacopea Europea. Preferiblemente, se usan condiciones estándar para precipitar la Fracción II a partir de la solución, que

luego se purifica para proporcionar un producto farmacéutico tal como inmunoglobulina intravenosa (IGIV) o inmunoglobulina subcutánea (IGSC).

La purificación adicional puede adoptar la forma de cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico, combinada con los pasos adecuados para asegurar la seguridad del virus de la IGIV o IGSC (ver Roberts et. al., Biologicals, vol. 43 (2), marzo de 2015, p123-129).

La solución rica en IgG que resulta de la extracción de las fracciones residuales puede procesarse por separado, combinarse con otra extracción de disolvente de las mismas fracciones residuales y/o combinarse con la extracción con disolvente de las fracciones residuales de otros lotes de procesos. Sin embargo, generalmente es más eficiente combinar estas soluciones con el intermedio del proceso de IgG a granel del principal proceso de producción de proteína diana. Por ejemplo, la IgG de la extracción con disolvente de la "fracción residual" se puede combinar con el sobrenadante rico en IgG de la etapa de fraccionamiento que produjo el precipitado residual relevante. Este puede ser el sobrenadante del mismo lote de fraccionamiento o de un lote diferente.

En otra alternativa, la IgG extraída de la fracción residual puede someterse a una o más de las mismas etapas de fabricación posteriores que se usan en el proceso de IgG principal, antes de combinarse con el intermedio de IgG a granel en una etapa de proceso posterior. Por ejemplo, la solución rica en IgG producida por lavado/extracción del precipitado B+I puede combinarse con el sobrenadante B+I que a continuación se procesa adicionalmente para obtener el producto final. Como alternativa, la solución rica en IgG producida mediante lavado/extracción del precipitado B+I puede procesarse a través de etapas posteriores del proceso tales como precipitación en etanol para obtener la Fracción II, antes de combinarse con el intermedio principal de la Fracción II de IgG procesado a partir del sobrenadante B+I y procesamiento para obtener el producto final. Cualquiera de las opciones puede ser preferida, dependiendo de la escala disponible de equipos de fabricación y logística asociada. El disolvente óptimo que se utilizará para la extracción puede depender en parte de cualquier etapa o etapas de procesamiento posteriores previstas.

En las Figuras 4 y 5 se muestran diversos puntos alternativos en los que la IgG extraída puede recombinarse con la corriente del proceso de IgG principal.

Las características preferidas de la invención se pueden combinar de cualquier manera. Por lo tanto, ciertas características que, por claridad, se describen en la presente memoria en el contexto de realizaciones separadas, se pueden combinar de cualquier manera. Por el contrario, varias características que, por brevedad, se describen en el contexto de una única característica preferida, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación. Además, la referencia a los valores indicados en intervalos incluye todos y cada uno de los valores dentro de ese intervalo.

Hay que tener en cuenta que no se requieren todas las actividades descritas anteriormente en la descripción general, que una parte de una actividad particular puede no ser necesaria, y que se pueden realizar una o más actividades adicionales además de las descritas. Aún más, el orden en que se enumeran las actividades no es necesariamente el orden en que se realizan.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran adicionalmente la presente invención.

En los siguientes Ejemplos/Tablas, los precipitados y los sobrenadantes se analizaron para determinar el contenido de proteína usando un autoanalizador 'SpaPlus' (The Binding Site, Birmingham, RU), que es una plataforma de análisis turbidométrico. Los factores de coagulación VII, IX, XI y XII se analizaron usando kits AssayPro ELISA (suministrados por Universal Biologicals, Cambridge, Reino Unido). El factor XIa se midió usando el kit de ensayo cromogénico Hyphen BioPhen (suministrado por Quadrantech Diagnostics, Epsom, Reino Unido).

La Tabla 1 siguiente muestra una composición típica de un precipitado de B+I que es una fracción residual (equivalente a la Fracción III de Cohn/Oncley) producida por el fraccionamiento en etanol en frío de Kistler & Nitschmann.

Tabla 1

| Proteína                   | Precipitado B+I    |         |
|----------------------------|--------------------|---------|
|                            | mg/litro de plasma | % total |
| alfa 1 glucoproteína ácida | 7                  | 0,1     |
| alfa 1 antitripsina        | 31                 | 0,5     |
| Inactivador C1             | 12                 | 0,2     |
| Ceruloplasmina             | 195                | 3,2     |

| Proteína                      | Precipitado B+I    |         |
|-------------------------------|--------------------|---------|
|                               | mg/litro de plasma | % total |
| Antitrombina III              | 77                 | 1,3     |
| Prealbúmina                   | 78                 | 1,3     |
| Glicoproteína B2              | 16                 | 0,3     |
| Globulina Gc                  | 51                 | 0,8     |
| alfa 2 macroglobulina         | 1240               | 20,6    |
| Hemopexina                    | 12                 | 0,2     |
| alfa 1 antitripsina           | 51                 | 0,8     |
| IgA                           | 1000               | 16,6    |
| IgG                           | 1100               | 18,3    |
| IgM                           | 710                | 11,8    |
| glucoproteína alfa 2 HS       | 27                 | 0,4     |
| Haptoglobina                  | 65                 | 1,1     |
| Albúmina                      | 204                | 3,4     |
| Fibrinógeno                   | 457                | 7,6     |
| Apolipoproteína B             | 506                | 8,4     |
| Inhibidor de la alfa tripsina | 168                | 2,8     |
| Transferrina                  | 9                  | 0,1     |
| Proteína total                | 6016               | 100     |

El material de partida para los experimentos descritos a continuación fue un precipitado B+I que contenía IgG, que tenía una composición similar a la mostrada en la Tabla 1.

- 5 En los siguientes ejemplos, la solución tamponada acuosa de etanol al 17 % en volumen se prepara de la siguiente manera:

hidrógenofosfato disódico dihidratado 7,1 mM (1,27 g/l)

- 10 ácido acético glacial 12,8 mM (0,77 g/l)

17 % en vol. de etanol en tampón de fosfato/acetato: se añaden 141,6 g de etanol al 96 % a 858,4 g de tampón de fosfato/acetato (el pH final es ~5,0 - 5,1).

#### 15 Ejemplo 1

- En un primer experimento, 97 g de precipitado B+I se resuspendieron rápidamente mediante homogeneizador a un pH de 4,8 a 5,2 en presencia de 1000 g de una solución tamponada acuosa de etanol al 17 % en volumen a un intervalo de temperatura de aproximadamente -3 °C a -7 °C, para dar una relación de precipitado a tampón de 1:10.
- 20 El tampón consistía en 17 % en volumen de solución acuosa de etanol que contenía fosfato y acetato ajustados al pH apropiado ("tampón de etanol").

- En un segundo experimento, 99 g del mismo precipitado B+I se resuspendieron de la misma manera en 1.000 g de etanol al 17 % en volumen en agua (es decir, solución de etanol sin tamponar) a un intervalo de temperatura de aproximadamente -3 °C a -7 °C. Ambas re-suspensiones se mezclaron después continuamente mediante agitación moderada y el precipitado se acondicionó (maduró) en las condiciones establecidas durante 24 horas. Las muestras de las resuspensiones tamponadas y no tamponadas se centrifugaron para recuperar el líquido enriquecido con IgG.

- La suspensión precentrifugada y el sobrenadante se analizaron para detectar la presencia de IgG y otras proteínas de interés (Tabla 2).

Tabla 2

Análisis del precipitado B+I resuspendido y de la fracción de sobrenadante de una solución acuosa de etanol al 17 % en volumen tamponada y no tamponada

| MUESTRAS |                      | 17 % en vol. de etanol en tampón fosfato/acetato |              | 17 % en vol. de etanol en agua |              |
|----------|----------------------|--------------------------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------|
|          |                      | Resuspensión                                     | Sobrenadante | Resuspensión                   | Sobrenadante |
| Análisis | Turbidez (NTU)       |                                                  | 23,5         |                                | 1,233        |
|          | IgG (mg/ml)          | 3,47                                             | 1,24         | 3,46                           | 2,23         |
|          | Albúmina (mg/ml)     | 0,76                                             | 0,33         | 0,81                           | 0,28         |
|          | IgA (mg/ml)          | 1,67                                             | 0,03         | 1,94                           | 0,43         |
|          | IgM (mg/ml)          | 0,85                                             | <0,11        | 0,94                           | 0,25         |
|          | Haptoglobina (mg/ml) | 0,06                                             | <0,025       | 0,06                           | 0,03         |
|          | FXIa (ng/ml)         | 153                                              | <0,6         | 105                            | 8,26         |
|          | FXI (µg/ml)          | 228                                              | <0,78        | 211                            | 17,0         |
|          | FXII (µg/ml)         | 25,4                                             | 0,87         | 44,5                           | 2,29         |
|          | Proteasa (U/ml)      | 547                                              | 7,22         | 425                            | >50          |
|          | Plasmina (UI/ml)     | 0,45                                             | 0,11         | 0,40                           | <0,1         |
|          | Plasminógeno (U/ml)  | NQ <sup>a</sup>                                  | 0,09         | 0,43                           | 0,79         |

5 <sup>a</sup>NQ = no cuantificable – DO de la muestra entre el blanco y el punto más bajo de la línea estándar

NTU = Unidades de la relación de turbidez nefelométrica, medidas usando un turbidómetro calibrado en NTU

De la Tabla 2 se puede ver que la resuspensión tanto en la solución de etanol acuoso al 17 % en volumen tamponada con fosfato/acetato ("tampón de etanol") como la solución de etanol sin tamponar extrajeron con éxito la IgG. El extracto de sobrenadante de etanol sin tamponar contenía una mayor concentración de IgG que el sobrenadante tamponado, pero el extracto de sobrenadante de etanol tamponado contenía IgG con una calidad más alta y una proporción mucho menor de IgA e IgM. La actividad proteasa, el Factor XI/XIa y el Factor XII también fueron inferiores en el extracto sobrenadante de etanol tamponado. Se han relacionado altas tasas de efectos secundarios tromboembólicos con los Factores XI y XIa en productos IGIV y, por lo tanto, es muy deseable no volver a extraerlos en la fracción sobrenadante. A diferencia del extracto de etanol/agua, el extracto de etanol/tampón fue similar en composición a la fracción de Sobrenadante B+I (que pasa a la Fracción II) y por lo tanto la mezcla de las dos fracciones es posible generar una Fracción II única de pureza equivalente que contiene un mayor rendimiento de IgG.

El rendimiento de IgG a partir del sobrenadante de etanol acuoso tamponado con fosfato/acetato fue equivalente a 0,55 g de IgG por litro de plasma, lo que representa un aumento del rendimiento de ~ 10 % de la IgG de plasma que puede traducirse en un rendimiento adicional del 10-20 % del Producto final IgG.

#### Ejemplo 2

En un segundo conjunto de experimentos, se investigó el efecto de reducir la relación de resuspensión para reducir el volumen total. En un experimento, se resuspendieron 500 g de precipitado B+I en 1000 g de solución acuosa de etanol tamponada (una parte de precipitado en dos partes de tampón). En otro experimento, 250 g del mismo precipitado B+I se resuspendieron en 1.000 g de tampón de etanol (una parte de precipitado en cuatro partes de tampón). Se tomaron muestras a intervalos durante la maduración para el análisis (Tabla 3).

Tabla 3

Efecto de la relación de resuspensión (precipitado:tampón de etanol) sobre la calidad del sobrenadante de la suspensión B+I durante 24 horas

| MUESTRAS     |                | Tiempo de maduración (Horas) |      |       |      |       |      |       |      |
|--------------|----------------|------------------------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|
|              |                | 0,5                          |      | 2,0   |      | 6,5   |      | 24    |      |
|              |                | Relación de resuspensión     |      |       |      |       |      |       |      |
|              | Método         | 1:2                          | 1:4  | 1:2   | 1:4  | 1:2   | 1:4  | 1:2   | 1:4  |
| Aná<br>lisis | Turbidez (NTU) | 3.432                        | 27,2 | 3.314 | 28,1 | 4.000 | 47,9 | 3.765 | 30,7 |
|              | IgG (mg/ml)    | 4,98                         | 2,69 | 4,69  | 2,78 | 3,97  | 2,85 | 4,30  | 1,83 |

|  |                  |      |       |      |       |      |       |      |       |
|--|------------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|
|  | Albúmina (mg/ml) | 0,96 | 0,48  | 0,87 | 0,57  | 0,74 | 0,63  | 0,85 | 0,39  |
|  | IgA (mg/ml)      | 0,30 | 0,02  | 0,34 | 0,03  | 0,37 | 0,04  | 0,32 | <0,02 |
|  | IgM (mg/ml)      | 0,18 | <0,11 | 0,19 | <0,11 | 0,20 | <0,11 | 0,20 | <0,11 |
|  | FXIa (ng/ml)     | 5,20 | <0,6  | 5,20 | <0,6  | 6,65 | <0,6  | 5,85 | <0,6  |

Los datos en la Tabla 3 indican que las relaciones de 1:2 y 1:4 permiten la extracción de IgG del precipitado y que el rendimiento y la calidad de la IgG extraída es mayor en la relación 1:4. Por ejemplo, la turbidez de los sobrenadantes 1:4, que es un indicador bruto de la calidad del material, fue dos órdenes de magnitud menor que los sobrenadantes de resuspensión equivalentes 1:2. Además, las concentraciones de contaminantes tales como IgM, IgA y Factor XIa, disminuyeron significativamente en el sobrenadante 1:4 en comparación con sobrenadante 1:2. Los datos de ambas pruebas experimentales también sugieren que la calidad y el rendimiento de IgG pueden mantenerse usando tiempos de maduración de aproximadamente dos horas o más. El rendimiento de IgG después de 2 horas de maduración fue de 0,47 g y 0,42 g de IgG por litro de plasma en los sobrenadantes 1:4 y 1:2, respectivamente.

#### Ejemplo 3

Se llevaron a cabo varias resuspensiones en una relación 1:4 para confirmar los resultados del Ejemplo 2. Se utilizó un lote diferente de material de partida en seis resuspensiones. En cada caso, se resuspendieron 250 g de precipitado B+I en 1.000 g de tampón de etanol acuoso como se describió anteriormente. La suspensión de precipitado se acondicionó a -5 °C mientras se mezclaba durante un mínimo de 2 horas. Al final del acondicionamiento, la resuspensión se centrifugó. Se analizaron tanto la resuspensión como el sobrenadante. Se calcularon la concentración de IgG y el rendimiento de IgG (equivalente en plasma) de los sobrenadantes (Tabla 4).

Tabla 4

| Contenido de IgG y rendimiento de re-suspensiones de B+I confirmatorias |                                                    |      |      |      |      |      |       |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|------|------|------|------|------|-------|
| MUESTRA                                                                 | Pruebas de confirmación 1:4 (B+I:tampón de etanol) |      |      |      |      |      | MEDIA |
|                                                                         | 1                                                  | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |       |
| IgG (mg/ml)                                                             | 4,40                                               | 2,18 | 3,07 | 2,83 | 2,89 | 4,73 | 3,35  |
| Rendimiento: IgG g/l PE                                                 | 0,75                                               | 0,35 | 0,52 | 0,48 | 0,49 | 0,8  | 0,57  |

El rendimiento medio de IgG fue de 0,57 g de IgG por litro de plasma. Mediante la adición a la corriente del proceso de fraccionamiento principal, este rendimiento puede traducirse en un aumento de rendimiento significativo, que representa una cantidad adicional de 0,57 g de IgG de cada litro de plasma procesado.

#### Ejemplo 4

Se resuspendieron 334 g del precipitado B+I en 1.335 g de tampón de etanol al 17 % en volumen y se mezcló durante 2 horas a una temperatura de -5 °C. La fase líquida ("primer extracto") se separó después de la fase sólida por centrifugación.

Se resuspendieron 274 g del precipitado en fase sólida en 1.096 g de tampón de etanol al 17 % en volumen y se mezcló durante 2 horas a una temperatura de -5 °C. La fase líquida ("segundo extracto") se separó a continuación de la fase sólida por centrifugación.

La suspensión precentrifugada y el sobrenadante de cada procedimiento se analizaron para detectar la presencia de IgG y varias otras proteínas de interés (Tabla 5). Esto confirmó que las extracciones secuenciales repetidas de precipitado de B+I produjeron IgG en la fase sobrenadante del disolvente, con reducción equivalente en otras proteínas.

Tabla 5

| Muestra              | Primer extracto (sobrenadante) | Segundo extracto (sobrenadante) |
|----------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| IgG (mg/ml)          | 4,22                           | 2,17                            |
| IgG (g por l plasma) | 0,71                           | 0,40                            |
| Albúmina (mg/ml)     | 0,95                           | 0,60                            |
| IgA (mg/ml)          | 0,26                           | 0,091                           |
| IgM (mg/ml)          | 0,18                           | 0,12                            |
| FXIa (ng/ml)         | 2,40                           | 1,31                            |

Ejemplo 5

El extracto del precipitado B+I se preparó mezclando una parte del precipitado con cuatro partes de tampón de etanol al 17 % en volumen durante dos horas a una temperatura de -5 °C. El extracto se separó después del precipitado residual por centrifugación.

El extracto del precipitado B+I se combinó después con sobrenadante B+I en una proporción de 1:10 en volumen. La composición del sobrenadante B+I se comparó con la composición del sobrenadante B+I combinado y el extracto de precipitado B+I (Tabla 6). Esto confirmó que el sobrenadante se podía combinar con el extracto de precipitado para aumentar la concentración de IgG mientras se conservaba un perfil de pureza de IgG aceptable.

Tabla 6

| Muestra          | Sobrenadante B+I | Sobrenadante B+I + Extracto de precipitado B+I |
|------------------|------------------|------------------------------------------------|
| IgG (mg/ml)      | 2,53             | 2,74                                           |
| Albúmina (mg/ml) | 0,22             | 0,31                                           |
| IgA (mg/ml)      | 0,02             | 0,04                                           |
| IgM (mg/ml)      | <0,099           | <0,099                                         |
| FXIa (ng/ml)     | <0,6             | <0,6                                           |
| FVII (ng/ml)     | 4,65             | 6,75                                           |
| FIX (ng/ml)      | 83,7             | 87,6                                           |
| FXII (ng/ml)     | 260              | 603                                            |

Ejemplo 6

Se acondicionaron 250 kg de precipitado B+I de plasma fraccionado de acuerdo con el método modificado de Kistler y Nitschmann a 0 °C ± 2 °C y se resuspendió mediante homogeneización a 0 °C ± 2 °C durante una hora en presencia de 1000 kg 17 % en volumen de tampón de etanol. La mezcla se maduró después a 0 °C ± 2 °C durante 2 horas, después de lo cual el pH era 5,14 y la conductividad era de 0,6 mS/cm. El extracto de sobrenadante se separó del precipitado por filtración o por centrifugación. Este método de extracción y recuperación por filtración o centrifugación extrajeron con éxito IgG de alta pureza del precipitado B+I (Tabla 7).

Tabla 7

| Muestra              | Extracto de sobrenadante B+I recuperado por filtración | Extracto de sobrenadante B+I recuperado por centrifugación |
|----------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| IgG (g/l)            | 2,22                                                   | 3,28                                                       |
| IgG (g por l plasma) | 0,36                                                   | 0,53                                                       |
| Albúmina (g/l)       | 0,41                                                   | 0,85                                                       |
| IgA (g/l)            | <0,02                                                  | 0,1                                                        |
| IgM (g/l)            | <0,10                                                  | <0,1                                                       |
| FXIa (ng/ml)         | NQ                                                     | 2,16                                                       |
| Plasmina (U/ml)      | <0,1                                                   | <0,1                                                       |
| Plasminógeno (U/ml)  | 0,15                                                   | 0,3                                                        |

Ejemplo 7

Se ajustaron 313 kg de filtrado del sobrenadante del Ejemplo 6 a una fuerza iónica de 3,9 mS/cm, se aumentó la concentración de etanol hasta el 25 % en volumen y se ajustó el pH a pH 6,9 por titulación con hidróxido de sodio 1 M y luego se incubó durante 6 horas a -6,5 °C para producir 2,4 kg de precipitado de Fracción II que se recogió por centrifugación. El precipitado de la Fracción II (Fr II) se disolvió en agua (FrII:agua = 1: 2). El análisis muestra que el extracto de sobrenadante del precipitado B+I es compatible con la posterior purificación adicional para producir IgG con bajos niveles de agregado (Tabla 8).

Tabla 8

| Composición del precipitado de la Fracción II redisoluto a partir del precipitado B+I extraído |                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Muestra                                                                                        | Precipitado FrII redisoluto del precipitado B+I extraído |
| IgG (g/l)                                                                                      | 88,1                                                     |
| IgG (g por l plasma)                                                                           | 0,32                                                     |
| Albúmina (g/l)                                                                                 | 6,91                                                     |
| IgA (g/l)                                                                                      | 0,59                                                     |
| IgM (g/l)                                                                                      | 0,23                                                     |
| FXIa (ng/ml)                                                                                   | 1,51                                                     |
| Plasmina (U/ml)                                                                                | <0,1                                                     |
| Plasminógeno (U/ml)                                                                            | 0,16                                                     |
| % agregado (por HPLC)                                                                          | 1,31                                                     |

Ejemplo 8

- 5 Cien g del precipitado B+I que se había almacenado congelado a menos de -30 °C se llevó a 0 °C sin agitación en un recipiente controlado a 0 °C (opción (a)) o en un recipiente que contenía 17 % en volumen de tampón de etanol que se controló a 0 °C (opción (b)). La temperatura se midió mediante sondas que se habían colocado en el precipitado antes de la congelación. Cuando la temperatura del precipitado alcanzó 0 °C  $\pm$  1 °C, se añadió 17 % en volumen de tampón de etanol al precipitado de la opción (a) y ambos precipitados se homogeneizaron antes de la
- 10 extracción de IgG en el tampón del disolvente con agitación durante no menos de 2 horas (maduración/acondicionamiento). El sobrenadante se separó después del precipitado restante y se analizó. Hubo una extracción de IgG equivalente del precipitado cuando se acondicionó a 0 °C con o sin tampón (Tabla 9).

Tabla 9

| Muestra              | Extracto sobrenadante del precipitado B+I condicionado a 0 °C |            |
|----------------------|---------------------------------------------------------------|------------|
|                      | Sin tampón                                                    | Con tampón |
| IgG (g/l)            | 5,21                                                          | 5,40       |
| IgG (g por l plasma) | 0,87                                                          | 0,94       |
| Albúmina (g/l)       | 1,51                                                          | 1,73       |
| IgA (g/l)            | 0,33                                                          | 0,50       |
| IgM (g/l)            | 0,32                                                          | 0,44       |
| FXIa (ng/ml)         | 8,14                                                          | 11,6       |
| Plasmina (U/ml)      | 0,22                                                          | 0,19       |
| Plasminógeno (U/ml)  | 0,57                                                          | 1,23       |

## REIVINDICACIONES

1. Un método para extraer IgG de una fracción de precipitado residual que se produce durante el fraccionamiento del plasma en etanol frío y que se separa de la corriente del proceso de fabricación de IgG principal, comprendiendo el método poner en contacto la fracción de precipitado residual con un disolvente adecuado para extraer IgG del precipitado, en el que la fracción de precipitado residual se produce durante una etapa de fraccionamiento para producir una fracción líquida (sobrenadante) que contiene IgG, en el que el disolvente adecuado es el mismo que el disolvente utilizado en la etapa de fraccionamiento que produjo el precipitado residual, y en el que el método para extraer IgG de la fracción de precipitado residual no implica ninguna etapa cromatográfica.

2. Un método para la separación de IgG del plasma o una fracción de plasma, comprendiendo el método

a) fraccionar el plasma o la fracción de plasma usando fraccionamiento con etanol frío para producir una fracción líquida que contiene la mayoría de la IgG presente en el plasma o una fracción de plasma, y una fracción de precipitado residual que contiene IgG adicional; y

b) extraer al menos parte de la IgG adicional de la fracción de precipitado residual usando un disolvente adecuado, en el que el disolvente adecuado es el mismo que el disolvente utilizado en la etapa (a) para producir el precipitado residual, y en el que el método para extraer IgG de la fracción de precipitado residual no implica ninguna etapa cromatográfica.

3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en el que la fracción líquida es sobrenadante III o I+III de Cohn o sobrenadante B o B+I de Kistler & Nitschmann o precipitado B o B+I modificado de Kistler & Nitschmann.

4. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la fracción de precipitado residual es la fracción III o I+III de Cohn, o el precipitado B o B+I de Kistler & Nitschmann o el precipitado B o B+I modificado de Kistler & Nitschmann.

5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el disolvente es etanol acuoso tamponado; preferiblemente en el que el disolvente es un tampón acuoso que contiene aproximadamente 13 % en volumen a aproximadamente 17 % en volumen de etanol.

6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el disolvente se tampona usando tampón de fosfato y/o acetato.

7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la relación entre la fracción de precipitado residual y disolvente es de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:10.

8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el disolvente que contiene IgG extraída se separa de cualquier sólido de precipitado residual restante, preferiblemente en el que el disolvente que contiene IgG extraída se separa de los sólidos del precipitado residual restante por filtración o centrifugación.

9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la IgG extraída se combina con IgG obtenida de la corriente principal del proceso de fabricación de IgG.

10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que la IgG extraída obtenida del precipitado residual se procesa adicionalmente para producir un producto de IgG farmacéutico, preferiblemente en el que el procesamiento adicional para producir un producto de IgG farmacéutico comprende la precipitación de la IgG extraída del disolvente.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la precipitación se consigue ajustando una o más de la concentración de etanol, la temperatura y el pH.

12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que la precipitación produce la Fracción II.

13. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 que comprende:

a1) recuperar el precipitado y el sobrenadante de un proceso de fraccionamiento de B+I modificado de Kistler y Nitschmann;

b1) homogeneizar el precipitado obtenido en la etapa a) y extraer la IgG a partir del mismo mezclando con 17 % en volumen de etanol acuoso en tampón de acetato/fosfato a 0 °C durante 1 a 3 horas; y después

c) separar el tampón que contiene la IgG extraída de cualquier precipitado restante.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además:

d) combinar el tampón que contiene la IgG extraída obtenida en la etapa c) con el sobrenadante B+I modificado de Kistler y Nitschmann obtenido en la etapa a1); o

en el que la etapa c) se realiza mediante filtración y en el que el método comprende además:

e) incubar la IgG extraída en etanol acuoso de acuerdo con las condiciones para la precipitación de la Fracción II modificada de Kistler y Nitschmann; y

f) recuperar el precipitado de la Fracción II enriquecido con IgG resultante.

15. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el producto de IgG extraído comprende no menos de 85 % en peso de monómero y dímero y no más de 10 % en peso de polímero y/o agregado, o en el que el producto de IgG extraído comprende una pureza de no menos de 90 % de gammaglobulina.

Fig. 1

Leyenda IGIV: inmunoglobulina intravenosa  
IGSC: inmunoglobulina subcutánea  
IGIM: inmunoglobulina intramuscular

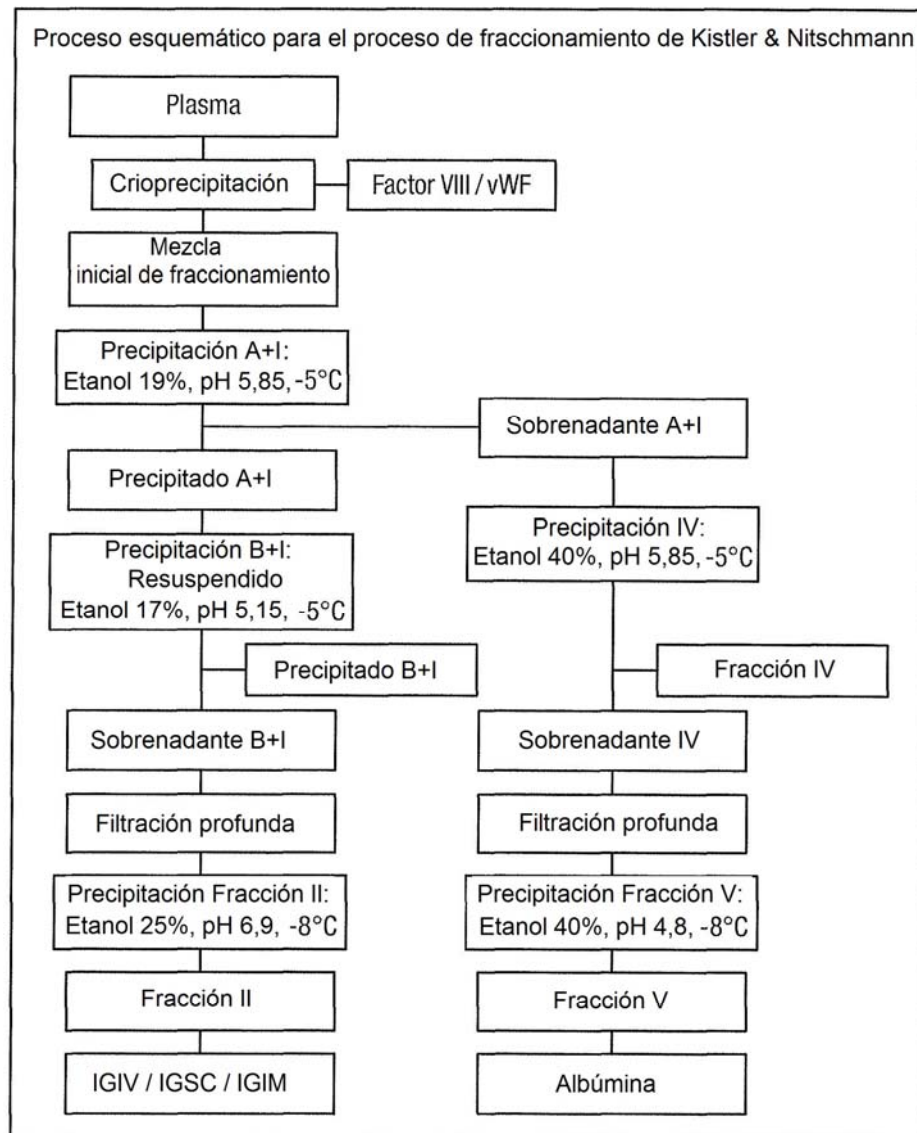


Fig. 2

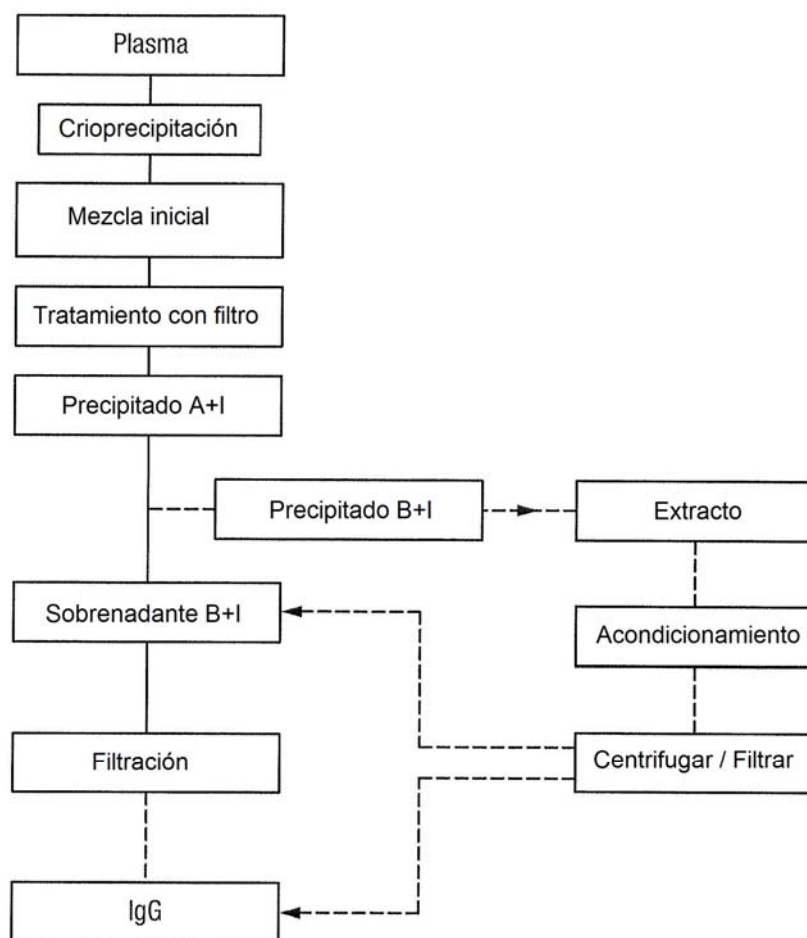
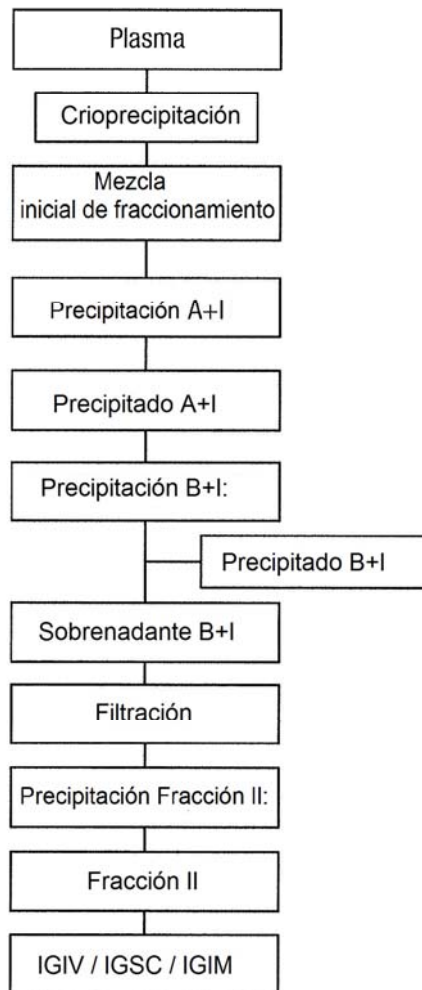


Fig. 3



Leyenda IGIV: inmunoglobulina intravenosa  
IGSC: inmunoglobulina subcutánea  
IGIM: inmunoglobulina intramuscular

Fig. 4

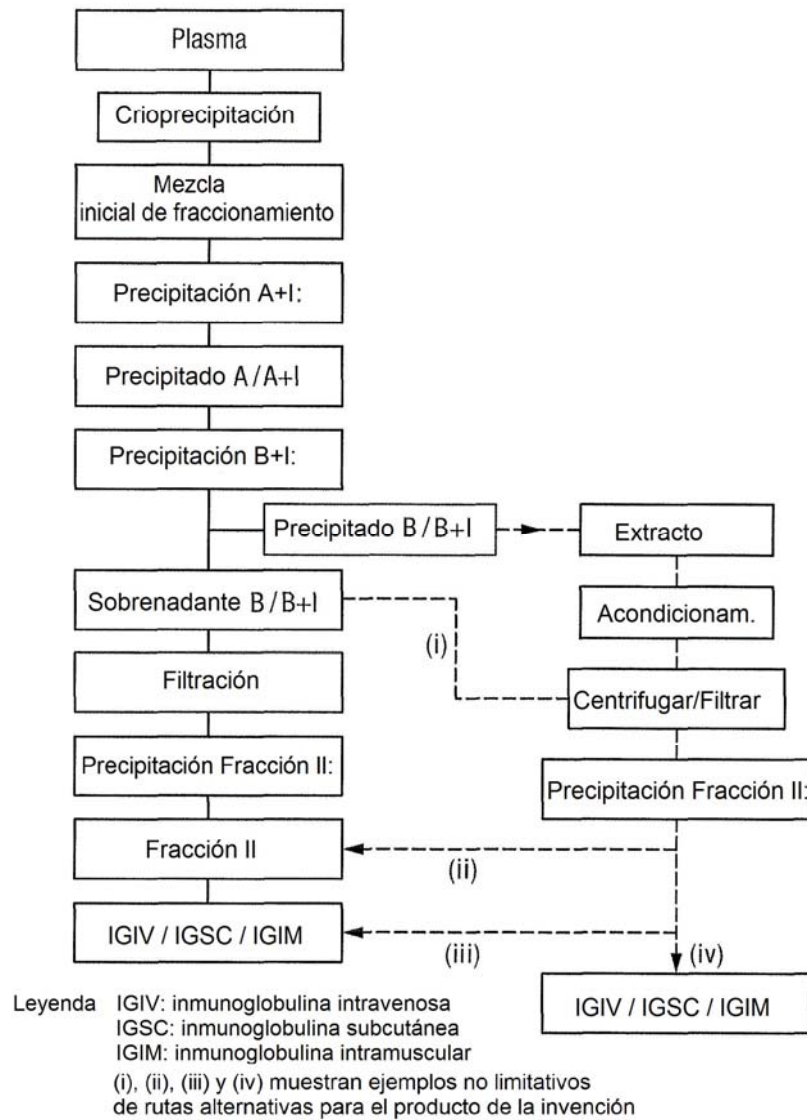
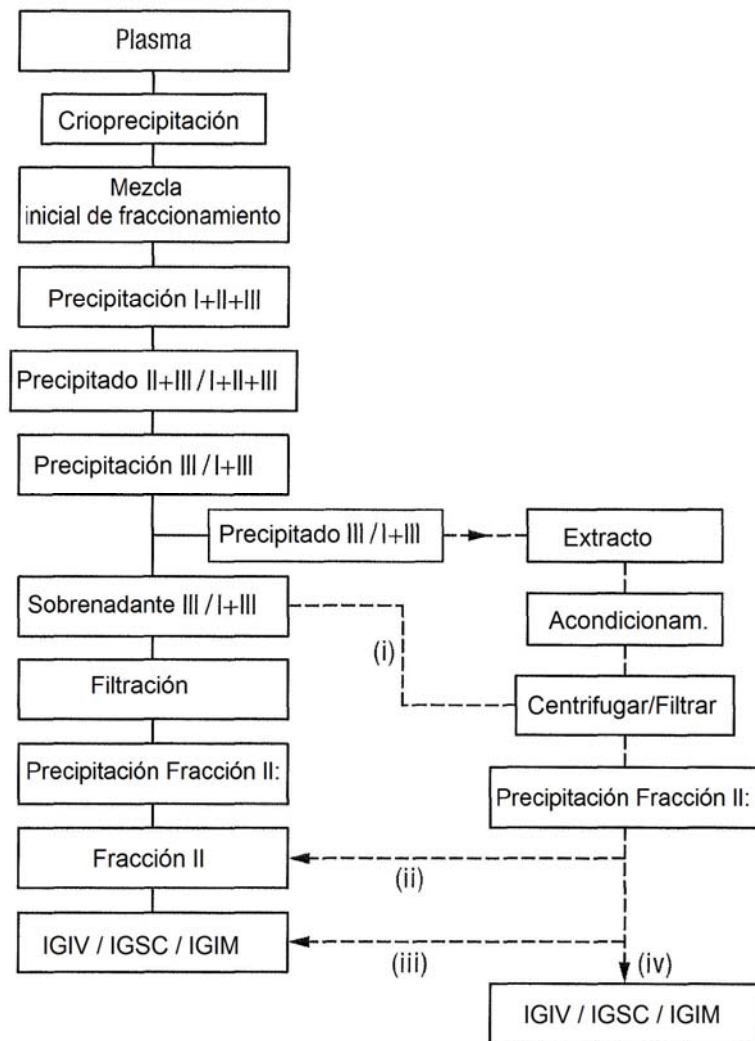


Fig. 5



Leyenda IGIV: inmunoglobulina intravenosa  
 IGSC: inmunoglobulina subcutánea  
 IGIM: inmunoglobulina intramuscular  
 (i), (ii), (iii) y (iv) muestran ejemplos no limitativos  
 de rutas alternativas para el producto de la invención