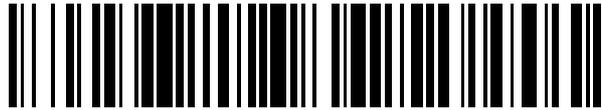


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 664**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C07K 1/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2006** E **11162751 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018** EP **2345425**

54 Título: **Concentrado de inmunoglobulinas G (IgG) empobrecido en anticuerpos anti-A y anti-B, y en IgG polirreactivas**

30 Prioridad:

**26.12.2005 FR 0513311**

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

**21.11.2018**

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;  
DHAINAUT, FRÉDÉRIC y  
PAOLANTONACCI, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 690 664 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

Concentrado de inmunoglobulinas G (IgG) empobrecido en anticuerpos anti-A y anti-B, y en IgG polirreactivas

5 La presente invención se refiere a un concentrado terapéutico de inmunoglobulina G (IgG), caracterizado por que presenta contenidos respectivos en anticuerpos anti-A y anti-B conformes a un resultado negativo al ensayo de Coombs indirecto *in vitro*, a la dilución 1/64, realizado con una solución de IgG de concentración inicial a 30 g/l y un contenido de IgG polirreactivas residuales comprendido entre el 0,01% y el 0,1%, con respecto al contenido total en IgG, midiéndose dicho contenido en IgG polirreactivas residuales por ELISA utilizando el antígeno albúmina modificada por unos grupos dinitrofenilo (Albúmina DNP).

10 La utilización de fracciones de plasma humano enriquecidas en inmunoglobulinas (Ig) para el tratamiento de diversas infecciones o déficits congénitos se conoce desde la elaboración del procedimiento de precipitación con etanol por Cohn (Cohn *et al.* 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459; Oncley *et al.* 1949, J. Am. Chem. Soc. 71,541).

15 Existe, con este fin, una necesidad creciente de producir concentrados de Ig altamente purificados, inyectables por vía intravenosa (IgIV), a partir, por ejemplo, de plasmas humanos. La complejidad de la estructura de las inmunoglobulinas (cuatro cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro), y la variedad de anticuerpos presentes en la mezcla de plasma de varios miles de donantes, son factores que actualmente no favorecen el desarrollo biotecnológico de las inmunoglobulinas. Aunque se produzcan anticuerpos monoclonales por ingeniería genética, su extrema especificidad constituye un inconveniente para las aplicaciones terapéuticas en las que parece necesaria una poliespecificidad.

20 Además, numerosas patologías, por ejemplo de origen autoinmune, se tratan actualmente con concentrados de IgG, lo que ha generado una situación de escasez en Europa y en Estados Unidos en los últimos años.

25 Los procedimientos de obtención de inmunoglobulinas, y especialmente de concentrados de IgG, pueden comprender, además de la precipitación selectiva de las proteínas por etanol, diversos tratamientos adicionales, tales como la precipitación por polietilenglicol, el tratamiento controlado por enzimas proteolíticas, etc., destinados a eliminar los agregados de polímeros de inmunoglobulinas susceptibles de activar el sistema del complemento con riesgos asociados de reacciones anafilácticas. Por otro lado, la presencia de dímeros en las IgGIV se ha correlacionado con caídas de la tensión arterial *in vivo* (Bleeker W.K. *et al.*, Blood, 95, 2000, p. 1856-1861).

30 Una vía alternativa a la precipitación por etanol se ha descrito por Steinbuch *et al.* (Rev. Frang. Y. Clin. y Biol. 1969, XIV, 1054) que recurren a la precipitación por ácido octanoico. Este ácido precipita la mayoría de las proteínas del plasma y deja las inmunoglobulinas en el sobrenadante. La purificación de estas inmunoglobulinas se realiza pasando por un intercambiador de aniones, DEAE-celulosa, en condiciones que no retienen las IgG. Después, la fracción de IgG no retenidas se concentra.

35 Se han desarrollado también diversos procedimientos para aumentar la pureza de los productos por la aplicación de técnicas cromatográficas. Se pueden citar particularmente las solicitudes de patente EP 0 703 922 y WO 99/64462, que describen la asociación de al menos dos etapas sucesivas de cromatografía, una por intercambio de aniones, la otra por de intercambio catiónico. La especificidad de estos procedimientos se proporciona por la propiedad de los intercambiadores de aniones de no retener las inmunoglobulinas G, en las condiciones de habituales de utilización, sino de fijar la mayor parte de las demás proteínas co-purificadas durante las etapas de prepurificación. Asimismo, se puede citar la solicitud de patente WO 02/092632, depositada por la solicitante, que divulga la preparación de concentrados de Ig usando una única etapa de cromatografía en intercambiador aniónico, realizada a un pH alcalino, para su retención en el soporte cromatográfico.

40 Sin embargo, numerosas publicaciones científicas indican que la inyección de IgG obtenidas por las técnicas de fraccionamiento anteriores puede provocar una hemólisis accidental, de las cuales algunas son graves, entre los pacientes en tratamiento. Como ejemplo, se pueden citar las publicaciones de Buchta C. *et al.*, Biologicals, 33, 2005, 41 - 48, Wilson J.R. *et al.*, Muscle & Nerve, 29(9), 1997, 1142-1145, Copelan E.A *et al.*, Transfusión, 26, 1986, 410-412, y Misbah S.A *et al.*, Drug Safety, 9, 1993, 254-262. El estudio de los efectos sobre la sangre de los pacientes que presentaban hemólisis, realizado particularmente usando el ensayo de Coombs directo (DCT), mostró que los hematíes están recubiertos de inmunoglobulinas dirigidas contra los antígenos A, B o D presentes en su superficie, provocando así su hemólisis. Por esta razón, las IgG disponibles en el mercado se obtienen a partir de plasmas seleccionados para evitar la presencia de inmunoglobulinas anti-D u otros anticuerpos con títulos elevados de anti-A o anti-B.

45 Buchta C. *et al.*, citado anteriormente, han considerado diferentes enfoques para reducir de modo significativo los anticuerpos anti-A, que provienen de donantes de grupos sanguíneos B y O, y anti-B, que proviene de donantes de grupos sanguíneos A y O, en los derivados de plasma, tales como las IgG, para minimizar así los riesgos de hemólisis, directamente correlacionados con los niveles de estos anticuerpos, durante el tratamiento de los pacientes con estos derivados plasmáticos. Particularmente, se considera elegir a los donantes, eliminar los anticuerpos anti-A y anti-B, producir derivados de plasma sanguíneo procedente de un grupo específico, grupos A

y/o B, o no incluir en los lotes los plasmas que tienen un título elevado de anticuerpos anti-A o anti-B. Algunos enfoques están considerados como no realistas debido al coste o la complejidad de las medidas que hay que tomar. Cabe señalar que los anticuerpos anti-A y anti-B se eliminan parcialmente durante el fraccionamiento etanólico que se ha mencionado anteriormente.

5 Puesto que las necesidades en IgG están en constante aumento, es necesario disponer de agrupamientos de donantes cada vez más importantes que, estadísticamente, serán mucho más ricos en grupo sanguíneo O. En consecuencia, los derivados sanguíneos, tales como las IgG, contienen cantidades de anticuerpos anti-A y anti-B demasiado elevadas para eliminarse por fraccionamiento convencional.

10 Estas necesidades crecientes no hacen tampoco factible seleccionar, por ejemplo, únicamente los donantes de grupo AB, para asegurarse un bajo contenido en anticuerpos anti-A y anti-B.

15 Cada lote de concentrados o preparaciones de IgG purificadas se controla frente a anticuerpos anti-A y anti-B según el ensayo de la Farmacopea Europea 2.6.20 (1997), el cual es una aplicación *in vitro* del ensayo de Coombs indirecta (ICT). El ensayo ICT consiste en añadir a una suspensión de hematíes, revestidos con anticuerpos anti-A o anti-B de tipo IgG contenidos en los concentrados de IgG, una solución de anticuerpos (antiglobulinas) dirigidos contra unidades de IgG humana. Estos anticuerpos se fijan sobre anticuerpos anti-A o anti-B fijados a los hematíes y permiten así su aglutinación por formación de puentes entre las IgG. El ensayo para la detección de anticuerpos anti-A o anti-B se inspira directamente por este ensayo clásico en serología hematológica (ensayo de Coombs).

Según la Farmacopea Europea, las IgIV no deben presentar aglutinación de los glóbulos rojos A o B en el ensayo ICT a la dilución 1:64 utilizada con una solución de IgG de concentración inicial llevada a 30 g/l.

25 Esta es la razón por la que conviene diluir las muestras de IgG a ensayar para obtener un título, es decir, el valor de la última dilución que ya no provoca aglutinación. Los resultados negativos al ensayo ICT sobre las soluciones de IgIV cuyas diluciones son inferiores a la dilución 1:64, según la Farmacopea Europea demuestran un bajo porcentaje en anticuerpo anti-A y anti-B aceptado por ésta. Sin embargo, con unos concentrados de IgG que dan un resultado negativo al ensayo prescrito por la Farmacopea Europea, es decir aquellos cuyo porcentaje de dilución es inferior a 30 1:64, los riesgos de reacciones hemolíticas no pueden excluirse (Buchta *et al.* ya citado).

Conviene señalar que las Farmacopeas Americanas y Japonesas no contienen ninguna disposición sobre la necesidad de controlar los contenidos residuales en anticuerpos anti-A y anti-B.

35 Como se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos anti-A y anti-B se eliminan parcialmente durante la preparación de concentrados de IgG por fraccionamiento etanólico, pero se observa un contenido residual que puede ser superior al límite de las normas altas de la Farmacopea Europea. Además, los concentrados preparados según el procedimiento elaborado por la solicitante y descrito en su solicitud de patente WO 02/092632 contienen más que los obtenidos por el fraccionamiento con etanol. Por lo tanto, es necesaria una purificación suplementaria 40 de los concentrados de IgG así obtenidos frente a AcaA y acaB, puesto que algunos lotes de concentrados de IgG pueden presentar unos contenidos superiores al límite admitido por la Farmacopea Europea para cada uno de ellos.

45 El documento KNEZEVIC-MARAMICA IRINA *et al.*: "Intravenous immune globulins: an update for clinicians.", TRANSFUSION. OCT 2003, vol. 43, nº 10, octubre de 2003, establece una revisión de las diferentes ventajas, inconvenientes e indicaciones terapéuticos que caracterizan las IVIG. Este documento divulga en particular que las IVIG distribuidas comercialmente contienen unos niveles medibles de anticuerpos anti-A y anti-B y que estos anticuerpos pueden conllevar la lisis de los hematíes en el receptor.

50 El documento NICHOLLS M D *et al.*: "HEMOLYSIS INDUCED BY INTRAVENOUSLY-ADMINISTERED IMMUNOGLOBULIN", MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA, vol. 150, nº 7, 1989, páginas 404-406, trata de la hemólisis inducida por las inmunoglobulinas administradas de manera intravenosa. Este documento analiza en particular la presencia de anticuerpos anti-A y anti-B en los concentrados de IVIg inyectados y muestra que algunos de estos anticuerpos están presentes en bajas cantidades.

55 Una de las técnicas para eliminarlas de los concentrados de IgG consiste en realizar una purificación por cromatografía de afinidad utilizando como soporte unos inmunoabsorbentes de tipo oligosacáridos similares a los antígenos A y B de los grupos sanguíneos, representando tales oligosacáridos en particular unos trisacáridos, injertados sobre una matriz cromatográfica.

60 A título de ejemplo, se puede citar la publicación de Mazid M.A *et al.*, J. Appl. Biomater., 3(1), 1992, 9-15, que utiliza un soporte cromatográfico a base de partículas de sílice sobre las cuales están injertados unos haptenos de oligosacáridos de síntesis característicos de los grupos sanguíneos A y B, en particular los "trisacáridos. Asimismo, Hout M.S *et al.* (ASAIO J, 46(6), 2000, 702-706) describe la realización de membranas fibrosas tubulares injertadas de antígenos específicos anti-A y anti-B para la eliminación de los anticuerpos anti-A y anti-B de la sangre total. Se explica también que tales soportes cromatográficos son muy estables, lo que limita la liberación de estos haptenos 65 residuales en los concentrados de interés.

La solicitud de patente WO 01/27623 describe un procedimiento de obtención de un plasma desespecificado en anticuerpos de grupos sanguíneos A y B, es decir un plasma que conviene a cualquier receptor. Estas especificidades se llevan esencialmente por unas inmunoglobulinas M (IgM). La desespecificación se obtiene por paso sobre un soporte de afinidad experimental para el grupo A y después sobre otro soporte de afinidad, también experimental, para el grupo B. En caso de presencia simultánea de anti-A y de anti-B (grupo O), es necesario el paso sucesivo sobre los dos soportes.

Una de las características suplementarias de los concentrados de IgG disponibles en el comercio es su polirreactividad. Conviene recordar que los anticuerpos policlonales tales como las IgG se combinan normalmente con un único epítipo (unidad antigénica) de manera única. Sin embargo, esta especificidad estricta de los anticuerpos puede a veces ampliarse a otras unidades antigénicas y presentar una afinidad para epítopos secundarios con una unión no obstante más débil que para la unidad nominal. Las IgG policlonales pueden reaccionar más o menos fuerte con unas estructuras tales como la actina, la miosina, la albúmina modificada por el trinitrofenilo.

Por este motivo, las inmunoglobulinas intravenosas (IgIV) son unas preparaciones de IgG humanas policlonales que contienen:

- unos anticuerpos inmunes dirigidos contra unos antígenos externos y que resultan de un proceso de inmunización,
- unos anticuerpos naturales que reconocen unas proteínas intracelulares, unos antígenos membrenarios de superficie, unas proteínas auto-circulantes y la región variable de otros anticuerpos. Estos últimos son denominados anticuerpos anti-idiotípicos (Kazatchkine M.D. *et al.*, Immunol. Rev., 139, 1994, 79-107).

Los anticuerpos naturales no resultan de una inmunización deliberada (Coutinho A. *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 7, 1995, 812-818). Son polirreactivos en el sentido en el que expresan unas afinidades variables para los auto-antígenos (Berneman A. *et al.*, Eur. J. Immunol., 22, 1992, 625-631 y Lacroix-Desmazes *et al.*, J. Immunol. Methods, 216, 1988, 117-137).

Unos tratamientos químicos (urea 6M, tiocianato de sodio 1,3 M y tratamiento ácido pH = 2,0) de las IGIV pueden aumentar la actividad polirreactiva de estas inmunoglobulinas policlonales (Bouvet J.P. *et al.*, J. Autoimmun., 16(2), 2001, 163-172). Sin embargo, no se ha demostrado jamás efecto beneficioso sobre pacientes tratados mediante tales inmunoglobulinas.

En resumen, la actividad polirreactiva de los anticuerpos presentes en una preparación de IgIV puede deberse a:

- la presencia de anticuerpos naturales contenidos en cada plasma individual,
- la presencia de anticuerpos anti-idiotípicos contenidos en cada plasma individual,
- la polirreactividad de los anticuerpos generada por el procedimiento de fabricación.

Así, algunos autores consideran que la polirreactividad es una propiedad intrínseca de las IgG que están, por lo tanto, naturalmente presentes en el organismo humano.

Otros demuestran que un procedimiento de purificación de las IgG monoclonales o policlonales pueden hacer aparecer una polirreactividad indetectable antes de la purificación. En efecto, los procedimientos de fabricación de las IgG a partir del plasma generan también una polirreactividad que se traduce por un "estrés" oxidativo y la carbonilación parcial de las IgG durante su utilización.

Esto se confirma por Bouvet J.-P. *et al.*, Journal of Autoimmunity, 16, 2001, p.163-172, para quien las IgG policlonales se vuelven fuertemente polirreactivas después de un tratamiento con urea en particular. Se indica también en este documento que una parte de la eficacia de las IgG en utilización clínica se atribuye a su polirreactividad.

Destaca que la polirreactividad de estos concentrados de IgG pueden por lo tanto explicarse por la presencia conjunta de IgG polirreactivas naturales y de aquellas polirreactivas obtenidas por los procedimientos de purificación habituales, y representan, según los casos, del 0,5 al 1% del conjunto de las IgG polivalentes. El tratamiento de pacientes por las preparaciones de IgG puede necesitar la administración de fuertes dosis, hasta 1 a 2 g/kg. Estas posologías conducen a tratar en un tiempo corto, por ejemplo en un día, mediante cantidades de 7 a 10 veces superiores a las de las IgG fisiológicas del receptor. En consecuencia, este porcentaje de IgG polirreactivas generadas por el procedimiento de fabricación en los concentrados de IgG es susceptible de generar efectos secundarios indeseables, tales como fiebres, nauseas o cefaleas.

Así, conviene realizar una distinción entre la polirreactividad de los anticuerpos debida a los anticuerpos naturales y anti-idiotípicos que, como lo ha demostrado la solicitante en su solicitud de patente EP 1 059 088, presenta unas ventajas de la polirreactividad de los anticuerpos generada por el procedimiento de fabricación. En efecto, la solicitante ha mostrado en su solicitud de patente EP 1 059 088 que unas fracciones de IgG polirreactivas contenidas naturalmente en el plasma, aisladas a partir de IgGIV polivalentes humanas, pueden ser ventajosamente utilizables para el tratamiento de algunas enfermedades inflamatorias, tal como la poliartritis reumatoide, debido a una menor posología requerida para esta fracción.

En consecuencia, para evitar reacciones indeseables tanto en el plano de la hemólisis de los hematíes como en el plano de las reacciones secundarias susceptibles de observarse por la administración masiva de las IgG durante un tratamiento, parece necesario disponer de concentrados de IgG para uso terapéutico, en particular para la inyección intravenosa, empobrecidos de manera significativa en anticuerpos anti-A y anti-B y que sean, preferentemente, de polirreactividad generada por el procedimiento de fabricación muy reducida con respecto a los concentrados de IgG actualmente disponibles en el comercio, teniendo al mismo tiempo una eficacia al menos idéntica en el plano de la inmunoterapia.

En consecuencia, la invención se refiere a un concentrado terapéutico de inmunoglobulinas G (IgG), caracterizado por que presenta contenidos respectivos en anticuerpos anti-A y anti-B conformes a un resultado negativo al ensayo de Coombs indirecto *in vitro*, a la dilución 1/64, realizado con una solución de IgG de concentración inicial llevada a 30 g/l y un contenido de IgG polirreactivas residuales comprendido entre el 0,01% y el 0,1%, con respecto al contenido total en IgG, midiéndose dicho contenido en IgG polirreactivas residuales por ELISA, utilizando el antígeno albúmina modificada por unos grupos dinitrofenilo (albúmina DNP).

En el ámbito de la invención, las IgG de estos concentrados representan ventajosamente las IgG policlonales obtenidas a partir del plasma sanguíneo o de una fracción de plasma sanguíneo ya enriquecido en IgG. Los concentrados de IgG para uso terapéutico están a concentraciones en IgG comúnmente utilizadas actualmente, comprendidas preferentemente entre 50 y 100 g/l. Estos concentrados están destinados a un uso clínico y pueden en particular inyectarse por vía intravenosa. Para este fin, deben asegurarse viralmente y, llegado el caso, contener excipientes, tales como unos estabilizantes, compatibles con este uso clínico.

La solicitante ha encontrado que era posible poner a disposición tales concentrados de IgG que presentan unos contenidos en anticuerpos anti-A y anti-B claramente inferiores a los observados en los concentrados de IgG estándares, es decir a los obtenidos por fraccionamiento etanólico y/o por la utilización de las técnicas de purificación que asocian unas cromatografías, como se ha mencionado anteriormente, y que no han sido objeto de un tratamiento complementario de eliminación de los anticuerpos considerados. Asimismo, sus contenidos son claramente inferiores a los umbrales aceptados por la Farmacopea Europea, lo que limita muy significativamente los riesgos de hemólisis en algunos receptores en tratamiento. Cuando se someten los concentrados de IgG de la invención a unos ensayos destinados a evaluar las cantidades de AcaA y AcaB, se observa que los resultados de los ensayos de aglutinación *in vitro* de los glóbulos rojos A, B y/o AB en presencia de anticuerpos anti-IgG humanos son sistemáticamente negativos, en particular a la concentración inicial de 30 g/l impuesta por el método de la Farmacopea Europea. La realización del ensayo de Coombs indirecto, definido anteriormente, con unos concentrados de IgG de la invención conduce por lo tanto a unos resultados sistemáticamente negativos, incluso con unas muestras de IgG como tales, no diluidas. Parece por lo tanto que el contenido en estos anticuerpos anti-A y anti-B en estos concentrados no se detecta ya por el ensayo ICT.

Cuando el porcentaje de anticuerpos anti-A y anti-B es muy bajo en los concentrados de IgG, el ensayo ICT no puede aplicarse más, con mayor motivo en las condiciones de la Farmacopea Europea, puesto que las reacciones de aglutinación de los hematíes no tienen lugar más, incluso con la adición de anticuerpos anti-IgG humanos, ya que la densidad de anticuerpos anti-A y anti-B es demasiado baja para el establecimiento de puentes entre los hematíes por unas uniones anticuerpos anti-A y anti-B fijados sobre los hematíes y los anticuerpos anti-IgG humanos.

Sin embargo, es posible verificar la presencia de estos anticuerpos anti-A y/o anti-B a muy baja concentración provocando la inmunohemólisis de los glóbulos rojos que han fijado estos anticuerpos y medir un empobrecimiento con respecto a un concentrado clásico que no ha sufrido un tratamiento de eliminación de AcaA y/o AcaB. La inmunohemólisis es una reacción inmunológica específica que se produce cuando el anticuerpo se fija a su diana en presencia de factores del complemento. La activación del sistema del complemento lleva a la liberación de perforinas que traspasan la membrana del glóbulo rojo, dejando salir la hemoglobina. Basta entonces medir mediante un método sensible, por ejemplo mediante trazadores radioactivos (véase más adelante), la cantidad de hemoglobina liberada, proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-A y/o anti-B presente.

La solicitante ha demostrado de manera particularmente ventajosa que el concentrado de IgG de la invención comprende un contenido en anticuerpos anti-A no superior a 23 ng/mg, de IgG, en particular comprendido entre 19 y 23 ng/ml de IgG, y un contenido en anticuerpos anti-B no superior a 20 ng/mg de IgG, en particular comprendido entre 12 y 20 ng/mg de IgG.

Ventajosamente, la solicitante ha encontrado que era también posible poner a disposición tales concentrados de IgG a muy bajo contenido en IgG polirreactivas, en particular aquellas generadas por el procedimiento de fabricación, confiriéndoles así un carácter casi no polirreactivo, siendo al mismo tiempo tan eficaz en el tratamiento de las inmunoterapias como los concentrados de IgG de la técnica anterior. Esta ausencia notable del carácter de polirreactividad de las IgG debido al procedimiento de fabricación reduce sustancialmente los riesgos de efectos secundarios susceptibles de generarse tras el tratamiento que necesita fuertes posologías.

Es también ventajosamente posible corregir los efectos indeseables relacionados con la presencia de IgG polirreactivas debido al procedimiento de fabricación en el concentrado de IgG generada en particular por el "estrés" oxidativo y la carbonilación durante los procedimientos de purificación.

Preferentemente, el contenido de IgG polirreactivas residuales está comprendido entre el 0,01% y el 0,1%, en particular entre el 0,07 y el 0,1%. En el ámbito de la invención, el contenido de IgG polirreactivas significa un porcentaje molecular o másico. Este contenido se determina por los métodos descritos por la solicitante en la solicitud de patente 1 059 088 o en los documentos Berneman *et al.*, Lacroix-Desmaze *et al.*, Bouvet *et al.*

La solicitud de patente EP1059088 describe unos métodos de determinación del contenido en Ig polirreactivas. Por ejemplo, esta solicitud describe la utilización de un ligante DNP-lisina acoplado a un gel de NHS. La concentración en IgG polirreactivas se mide después por nefelometría. Por otro lado, la reactividad de las IgG así obtenidas se detecta por ELISA sobre un panel de autoantígenos seleccionados en particular entre la actina, la miosina, la MBP y la tubulina.

En los documentos Berneman *et al.*, Lacroix-Desmaze *et al.*, Bouvet *et al.*, la polirreactividad de las IgG se detecta mediante ELISA sobre un panel de antígenos, que comprende en particular los antígenos actina, miosina, TNP-ovalbúmina, (TNP-Ova), ver en particular Berneman *et al.*, página 630, párrafo "3.4 Polyreactivity of normal IgG" y tabla 3, página 631 y la leyenda de la tabla 3, página 631; Bouvet *et al.*, página 164, párrafo "ELISA" y figura 1, página 165; Lacroix-Desmazes *et al.*, página 122, párrafo "4.Target autoantigens and natural autoantibody repertoires", líneas 1 a 5.

Los concentrados de IgG según la invención se definen, por lo tanto, por una ausencia notable de los principios activos anticuerpos anti-A y anti-B que se dirigen contra los epítomos presentes en los glóbulos rojos.

Los concentrados de IgG pueden presentarse en forma líquida o liofilizada en presencia de estabilizantes apropiados, y almacenarse en espera de una utilización ulterior. Estos estabilizantes representan ventajosamente los realizados por la solicitante en su solicitud de patente WO 2004/091656 A2, a saber una mezcla de un azúcar alcohólico, preferentemente el manitol, el sorbitol o sus isómeros, de glicina y de un detergente no iónico, tal como el Tween<sup>®</sup>80, el Tween<sup>®</sup>20, el Triton<sup>®</sup> X 100 o el Pluronic<sup>®</sup>F68, siendo estos tres compuestos aceptables en el plano farmacéutico.

Las concentraciones de la formulación se determinaron por la solicitante para estabilizar las formas líquidas y/o liofilizadas.

Preferentemente, las concentraciones finales en los concentrados de manitol están comprendidas entre 30 g/l y 50 g/l, las del detergente entre 20 y 50 ppm, y las de la glicina entre 7 g/l y 10 g/l. Las concentraciones de estos compuestos representan las concentraciones finales en los concentrados de IgG.

Tales concentrados de IgG, de uso terapéutico, pueden inyectarse en particular por vía intravenosa, como se ha indicado anteriormente. Para ello, los concentrados de IgG según la invención deben asegurarse viralmente, por ejemplo, mediante un tratamiento clásico con disolvente-detergente conocido en la técnica anterior, utilizando por ejemplo una mezcla Tween<sup>®</sup>80/TnBP o Triton<sup>®</sup> X 100 /TnBP, y/o sufrir unas etapas de filtración para eventualmente eliminar los virus y/u otras macromoléculas que no hubieran sido eliminadas por el tratamiento virucida de disolvente-detergente, tales como el prion, agente responsable de las encefalopatías espongiiformes transmisibles.

El procedimiento de obtención de un concentrado de IgG tal como se ha mencionado anteriormente, que comprende las etapas siguientes de:

- a) preparación un concentrado de IgG por fraccionamiento etanólico y/o por separación cromatográfica, que asocia una etapa de inactivación viral,
- b) cromatografía de inunoafinidad por percolación de dicho concentrado de IgG sobre una mezcla de soportes cuyas matrices se injertan de grupos oligosacarídicos antigénicamente similares a los grupos sanguíneos A y B, y
- c) filtración de eliminación del virus y/o las partículas de tamaño superior a 20 nm.

La solicitante ha encontrado de manera sorprendente que no solamente tal procedimiento podría realizarse muy ventajosamente a escala industrial, sino que la combinación de etapas que llevan a la preparación de concentrados

de IgG y de una etapa específica de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B permitía obtener un concentrado de IgG según la invención, para uso terapéutico, que comprende además, preferentemente, un porcentaje de IgG polirreactivas inferior al 0,1% con respecto al contenido total en IgG. Además, tal concentrado comprende un porcentaje de AcaA y AcaB indeseables muy inferior al valor límite bajo del ensayo descrito en la Farmacopea Europea e incluso que da un resultado negativo por la utilización del ensayo ICT con tales muestras no diluidas.

Preferentemente, la etapa a) del procedimiento puede ser en sí misma un procedimiento de obtención de concentrados de IgG, tales como los mencionados anteriormente. Se trata de un fraccionamiento etanólico desarrollado por Cohn *et al.* o bien de una separación cromatográfica, tal como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0 703 922 y WO 99/64462. Se prefieren muy particularmente los procedimientos elaborados por la solicitante en las solicitudes de patente WO 94/29334 y WO 02/092632 A1, y muy particularmente aquel descrito en el documento WO 02/092632 A1. En este caso, la etapa a) del procedimiento de la invención comprende una prepurificación por precipitación de contaminantes lipídicos a partir de un plasma sanguíneo o de una fracción de plasma sanguíneo enriquecido en IgG, una cromatografía única sobre un soporte de resina intercambiadora de aniones efectuada a pH alcalino, una elución selectiva de las IgG en una etapa por un tampón apropiado a pH comprendido entre 4 y 7.

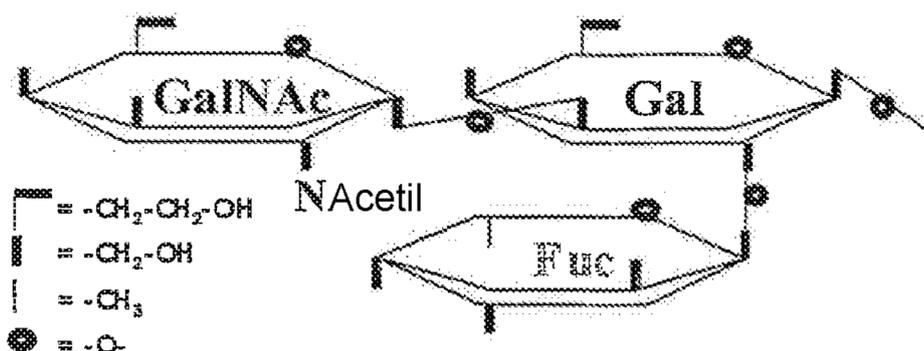
La etapa a) del procedimiento comprende un tratamiento de inactivación viral, preferentemente efectuada por disolvente-detergente, como se describe por Horowitz en la patente US 4 764 369. Se realizará juiciosamente en particular, llegado el caso, antes de una o la etapa de cromatografía subsiguiente que permite eliminar en particular los restos químicos de este tratamiento.

La fracción de IgG así recogida está ya bastante concentrada, y puede después sufrir unas etapas de concentración suplementaria por ultrafiltración y de filtración esterilizante.

Este concentrado se somete después a una etapa cromatográfica de inmunoafinidad sobre una mezcla de dos soportes injertados de grupos antigénicamente similar a los grupos sanguíneos A y B, preferentemente sobre una columna llena de tal mezcla de soportes.

Preferentemente, el soporte cromatográfico está constituido de una matriz de polímero natural reticulado, de tipo agarosa, sobre la cual se injertan unos espaciadores o unos brazos de acoplamiento, siendo a su vez injertados con unos oligosacáridos que representan ventajosamente unos trisacáridos que corresponden a los epítomos de los grupos sanguíneos A y B. En particular, se obtienen muy buenos resultados utilizando tal soporte de los cuales los trisacáridos, que corresponden al epítomo del grupo sanguíneo A, presentan la estructura N-acetilgalactosamina (GalNAc) – Galactosa (Gal) – Fucosa (Fuc), y los que corresponden al epítomo del grupo sanguíneo B, presentan la estructura Galactosa-galactosa-fucosa. Tal soporte representa muy ventajosamente un gel o resina disponible en el comercio bajo la denominación GLYCOSORB ABO<sup>®</sup>, que proviene de Glycorex Transplantation AS (Suecia).

A título de ejemplo, si este soporte se utiliza, el trisacárido que corresponde al epítomo del grupo sanguíneo A presenta la estructura siguiente:

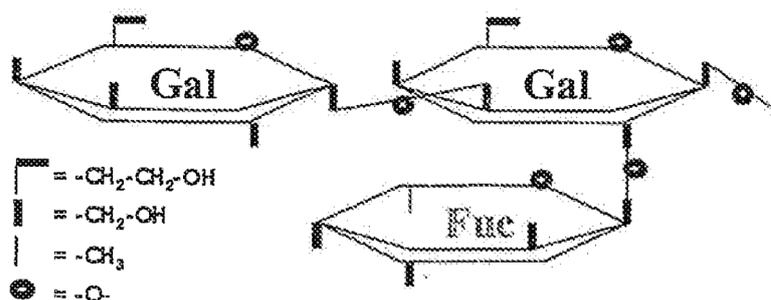


N-acetilgalactosamina (GalNAc)

Galactosa (Gal)

Fucosa (Fuc).

A título de ejemplo, si este soporte se utiliza, el trisacárido que corresponde al epítomo del grupo sanguíneo B presenta la estructura siguiente:



Ventajosamente, la mezcla de soportes injertados de grupos antigénicamente similares al grupo sanguíneo A y al grupo sanguíneo B está en una proporción respectiva comprendida entre 25/75 y 75/25 (v/v). En efecto, es posible
 5 ajustar la proporción de los dos soportes en la columna a la población de los donantes según la distribución de los grupos sanguíneos de esta. En el ámbito de una utilización habitual, la columna se llenará preferiblemente con una mezcla de 50/50 (v/v) en cada soporte específico anterior. Se pueden utilizar unas columnas analíticas de 15 a 25 cm de longitud y de 0,5 a 1 cm de diámetro. En el caso de una realización a escala piloto, se pueden utilizar unas columnas de 40 a 60 cm de longitud y de 40 a 60 mm de diámetro. En este caso, es posible cargar la columna de
 10 600 ml de soporte de inmunoadfinidad.

Tal soporte se almacena en NaOH 1M entre dos ciclos de utilización. Antes de la utilización, se lava con agua.

Se carga después la columna cromatográfica de inmunoadfinidad en concentrado de IgG, preferentemente a razón de
 15 0,2 a 4 litros, en particular de 1 a 2 litros, por mililitros de soporte. La especificidad de tal soporte no necesita un acondicionamiento previo de la fracción de IgG, es decir que cualquier fracción o concentrado de IgG obtenida mediante las técnicas de fraccionamiento de plasma de la técnica anterior puede convenir.

La percolación de concentrado no hace intervenir el mecanismo de elución. En consecuencia, sea cual sea la
 20 manera en la que se obtiene el concentrado de IgG, está percolado a través de la columna, eventualmente gracias a una bomba. Esta percolación permite la retención de AcaA y AcaB y de las IgG polirreactivas. Ventajosamente, la columna se lava después mediante agua para recuperar las IgG todavía presentes en el volumen muerto de la columna.

Después de la percolación del concentrado de IgG, se obtiene una fracción de IgG empobrecida en AcaA y AcaB,
 25 así como en IgG polirreactivas procedentes del procedimiento de fabricación. En efecto, AcaA y AcaB se retienen sobre sus unidades antigénicas del soporte cromatográfico que modifica la conformación. Por lo tanto, las IgG polirreactivas generadas durante el procedimiento de fabricación se retienen también sobre los sitios revelados por este cambio conformacional. La afinidad de estas IgG polirreactivas retenidas de manera secundaria es mucho menos importante que la de AcaA y AcaB. Es posible eluirlas de manera fraccionada, después del paso de las IgG,
 30 por la utilización de un tampón de elución que contiene, por ejemplo, una sal de metal alcalino-térreo de concentración comprendida entre 0,1 y 1,5 M, a un pH de 3-8,6.

El procedimiento puede comprender, después de la etapa b), unas etapas de concentración por ultrafiltración y de
 35 filtración esterilizante.

La columna cromatográfica y el soporte se lavan después con una solución ácida, tal como glicina-HCl, pH 2,8, para
 40 la desorción de AcaA y AcaB retenidos sobre el soporte. Este soporte se aclara después con agua y se trata con una solución de NaOH 1M.

El concentrado de IgG muy empobrecido en AcaA, AcaB e IgG policreativas se somete después a una filtración de
 45 eliminación de virus resistentes al tratamiento por disolvente-detergente y/u otras partículas de tamaño superior a 20 nm, tales como los priones, los polímeros de IgG generados durante etapas de fabricación, los lipopolisacáridos en micelas, los ácidos nucleicos y las proteínas agregadas. Tal tratamiento representa ventajosamente la nanofiltración, realizada por unos filtros de porosidad decreciente de 100 a 15 nm, en particular sobre tres filtros depositados en serie y de umbrales de retención decrecientes, de 100, 50 y 20 nm.

El procedimiento puede comprender, después de la etapa c), una etapa suplementaria de adición de estabilizantes a
 50 fin de, por un lado, asegurar la estabilidad de los concentrados de IgG durante la conservación en el tiempo y, por otro lado, permitir una liofilización evitando la desnaturalización de las IgG en las diversas fases asociadas a esta. Preferentemente, se añadirá una formulación estabilizante única, farmacéuticamente aceptable, que responde al objetivo de asegurar la estabilización de las dos formas de conservación consideradas de las IgG al mismo tiempo, a saber en forma líquida o liofilizada, y conservar, incluso mejorar, la eficacia terapéutica de estas IgG, como se describe en la solicitud de patente WO 2004/091656 A2.

55

Según otros modos de realización, es también posible recuperar selectivamente otras inmunoglobulinas, como se describe en la solicitud de patente WO 02/092632 A1.

5 Los concentrados de IgG se someten eventualmente a una etapa ulterior de concentración por ultrafiltración, después a una filtración esterilizante y pueden ser envasados en frascos y se conservan preferentemente a temperaturas próximas a 4°C.

10 Como se ha explicado ampliamente anteriormente, los concentrados de IgG según la invención comprenden unos contenidos en AcaA y AcaB muy inferiores a los umbrales admitidos por la Farmacopea Europea. En consecuencia, el método de evaluación 2.6.20 (1997) que se indica, aquí puede resultar insuficientemente sensible para detectar los anticuerpos considerados presentes en cantidades muy bajas en los concentrados de IgG de la invención. Por lo tanto, es esencial elaborar unos métodos de evaluación de estos anticuerpos que tengan un umbral de detección más bajo que el del ensayo ICP de la Farmacopea Europea aplicado a la detección de AcaA y AcaB.

15 Tal método de evaluación de los anticuerpos anti-A y/o anti-B en los concentrados de IgG de la invención comprende las etapas que consisten en:

a) preparar y calibrar una suspensión de hematíes del grupo sanguíneo A, B y/u O Rhesus +.

20 b) preparar unas soluciones de anticuerpos anti-D monoclonal en un intervalo de concentraciones que va de 0 a 200 ng/ml en un tampón biológicamente aceptable,

25 c) poner en contacto dichos hematíes con unas muestras de soluciones de IgG o con las soluciones de anticuerpos anti-d monoclonal, e incubar las mezclas de hematíes así obtenidas durante un tiempo predeterminado,

d) añadir en cada mezcla de hematíes un fragmento de anticuerpos anti-IgG humanas F(ab')<sub>2</sub> marcado mediante un fluoróforo e incubar dichos hematíes,

30 e) someter cada mezcla de hematíes obtenida en la etapa d) a una citometría de flujo,

f) determinar el contenido en anticuerpos anti-A y/o anti-B en los concentrados de IgG.

35 Un modo de realización de tal método de determinación del contenido en anticuerpos anti-A y/o anti-B puede comprender la preparación de una suspensión de hematíes al 1% (v/v) del grupo sanguíneo A, B y/u O en un tampón FBS, de pH comprendido entre 7,0 y 7,4, que contiene del 0,8 al 1,5% en peso de albúmina sérica bovina BSA. Los hematíes de la suspensión se cuentan en un dispositivo de citometría de flujo habitual, cuya utilización es conocida por el experto en la materia, y después, a fin de calibrar la suspensión a 37 a 43.10<sup>6</sup> hematíes/ml de suspensión.

40 Se preparan soluciones de anticuerpos anti-D monoclonales, cuyas concentraciones están comprendidas en el intervalo que va de 0 a 200 ng/ml de tampón, preferentemente un tampón PBS, de pH comprendido entre 7,0 y 7,4, que contiene, llegado el caso, del 0,8 al 1,5% en peso de albúmina sérica bovina BSA. Cada solución así preparada se determina por absorptiometría a fin de determinar su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ).

45 Los concentrados de IgG de la invención se ajustan después a una concentración comprendida en el intervalo de valores que va de 1 a 5 mg/ml, preferentemente de 1 mg/ml, mediante un tampón PBS, de pH comprendido entre 7,0 y 7,4, que contiene del 0,8 al 1,5% en peso de albúmina sérica bovina BSA.

50 Se coloca un volumen de 50 a 100  $\mu$ l de la suspensión de hematíes de cada grupo sanguíneo en cada pocillo de una microplaca, por ejemplo de 96 pocillos, después de 50 a 100  $\mu$ l de soluciones de IgG en esta suspensión de hematíes, o de 50 a 100  $\mu$ l de soluciones de anticuerpos anti-D en esta suspensión de hematíes.

55 El conjunto se pone a incubar durante tiempos comprendidos entre 1h30 y 2h30, en particular 2h, a temperaturas habitualmente comprendidas entre 30 y 40°C, preferentemente 37°C.

60 Las diferentes mezclas de hematíes así obtenidas se lavan después preferentemente con el tampón PBS que contiene la BSA anterior y se centrifugan, después se añade en cada mezcla de hematíes, contenidos en un pocillo de microplacas, de 50 a 100  $\mu$ l de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humanas marcadas de un fluoróforo, tal como, por ejemplo, la ficoeritrina, presentes en el tampón PBS y de BSA definido anteriormente.

La incubación del conjunto se realiza durante aproximadamente 20-30 minutos protegido de la luz.

65 Las diferentes mezclas de hematíes así obtenidas se lavan después y se someten a una citometría de flujo realizada con cualquier aparato disponible en el comercio que comprende un dispositivo de detección de fluorescencia de los compuestos analizados.

La intensidad media de fluorescencia (IMF) se obtiene en función de la concentración en anticuerpo monoclonal anti-D y la ecuación de la recta de regresión se obtiene mediante el programa Excel. Después, para cada muestra, la concentración en equivalente anticuerpo anti-D se obtiene utilizando la ecuación lineal de la recta de regresión. Las muestras se evaluaron por triplicado, por lo tanto se establece la media de la concentración y el coeficiente de variación se calcula mediante el programa Excel.

Se deduce el contenido en anticuerpos anti-A y anti-B en los concentrados de IgG según la invención que es el ventajosamente dado anteriormente.

Preferentemente, un método de evaluación de AcaA y AcaB de los concentrados de IgG anterior se efectúa por citometría de flujo adaptada al contexto de la invención, cuyo principio se basa en la utilización de hematíes humanos de grupo A o B, según la determinación específica del título de AcaA y AcaB deseada, utilizando la detección de una señal de fluorescencia proporcional al contenido en estos anticuerpos.

Tal método de determinación comprende las etapas que consisten en:

- a) preparar y calibrar una suspensión de hematíes del grupo sanguíneo A o B,
- b) poner en contacto dichos hematíes con unas muestras diluidas de soluciones de IgG, e incubar la mezcla así obtenida durante un tiempo predeterminado,
- c) incubar dichos hematíes en presencia de un anticuerpo anti-IgG marcado mediante un fluoróculo, y
- d) someter la suspensión de hematíes obtenida en la etapa c) a una citometría de flujo.

Se prepara una suspensión de hematíes al 1% (v/v) del grupo sanguíneo A o B en un tampón PBS, de pH comprendido entre 7,0 y 7,4, que contiene del 0,8 al 1,5% en peso de albúmina sérica bovina BSA. Los hematíes de la suspensión se cuentan en un dispositivo de citometría de flujo habitual, cuya utilización es conocida por el experto en la materia, después a fin de calibrar la suspensión a  $37 \text{ a } 43 \cdot 10^6$  hematíes/ml de suspensión.

Se coloca un volumen de 50 a 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, después de 50 a 100  $\mu\text{l}$  de diferentes soluciones de IgG diluidas de dos en dos a partir de una solución de 30 g/l hasta obtener una solución de IgG a 0,234 g/l.

El conjunto se pone a incubar durante tiempos comprendidos entre 1h30 y 2h30, en particular 2h, a temperaturas habitualmente comprendidas entre 30 y 40°C, preferentemente 37°C.

Los hematíes se lavan después con el tampón PBS que contiene el BSA anterior y se centrifugan, después se añade en cada pocillo de 50 a 100  $\mu\text{l}$  de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humanas marcadas de un fluoróculo, tal como, por ejemplo, la ficoeritrina.

La incubación del conjunto (etapa c) se realiza durante aproximadamente 20-30 minutos protegido de la luz.

La suspensión así obtenida se lava después y se somete a una citometría de flujo realizada con cualquier aparato adecuado disponible en el comercio que comprende un dispositivo de detección de fluorescencia de los compuestos analizados.

A título de ejemplo, los contenidos en anticuerpos anti-A y B de tres concentrados de IgG denominados B1, B2 y B3, preparados respectivamente por fraccionamiento etanólico según el método de Cohn (citado anteriormente) (B1), según la solicitud de patente WO 02/092632 (B2) y según la solicitud de patente WO 02/092632 seguida de una cromatografía de inmutioafinidad (B3) para el empobrecimiento en anticuerpos anti-A y anti-B, se presentan en la tabla 1 siguiente. Los resultados se presentan con respecto al título control en anticuerpos anti-A y anti-B de la muestra B1 cuyo contenido en estos anticuerpos se ha fijado arbitrariamente a 1, a título de referencia.

Tabla 1

Muestra	Título en anticuerpos anti-A	Título en anticuerpos anti-B
B1	1	1
B2	3,65	3,85
B3	0,68	0,52

Los resultados de esta tabla muestran en primer lugar que los contenidos en anticuerpos anti-A y anti-B de los concentrados de IgG (B1), preparados según el método de Cohn, contienen aproximadamente cuatro veces menos que los concentrados de IgG (B2), preparados según el método descrito en el documento WO 02/092632. Además,

el tratamiento ulterior de estos concentrados de IgG por unas columnas de inmovilización específicas reducen el título en anticuerpos anti-A de un factor próximo de 5 y de un factor próximo a 7 en anticuerpos anti-B (B3).

5 Otro método de determinación del contenido en anticuerpos anti-A y anti-B que puede realizarse ventajosamente consiste en la lisis por el complemento *in vitro*, conocido por el experto en la materia, pero que se ha elaborado específicamente para las necesidades de la invención.

Tal método de evaluación comprende las etapas que consisten en:

- 10 a) proceder a un radiomarcado de una suspensión de hematíes papainados seleccionados entre los grupos sanguíneos A, B, AB y O, previamente contados, por un marcador radioactivo apropiado,
- b) poner en contacto los hematíes radiomarcados con unas muestras de concentrados de IgG en un volumen predeterminado,
- 15 c) añadir un volumen idéntico a aquel de la etapa b) de suero normal del grupo sanguíneo AB,
- d) incubar la mezcla obtenida en la etapa c) durante un tiempo predeterminado, y
- 20 e) medir la radioactividad de la solución incubada así obtenida.

Se prepara una suspensión de hematíes papainados al 1% (v/v) del grupo sanguíneo A, B, AB u O que se cuenta después en una célula de Malassez para obtener  $10^6$  hematíes. Se añaden 100  $\mu$ Ci de  $^{51}\text{Cr}$  (1 volumen para 1 volumen de hematíes). Se incuba el conjunto entre 1 y 2 horas, y los hematíes radiomarcados se lavan después entre 4 y 6 veces.

25

Los hematíes radiomarcados se ponen después en contacto con unas muestras de concentrados de IgG, a una concentración comprendida preferentemente entre 1 y 3 mg/ml, en particular 1,2 mg/ml para  $4-6 \cdot 10^6$  hematíes radiomarcados, en un volumen por ejemplo de 100  $\mu$ l.

30

Un volumen idéntico al anterior, por ejemplo de 100  $\mu$ l, de suero normal de grupo sanguíneo AB se añade después a la mezcla anterior para aportar los diferentes factores de la vía de complemento.

35 La mezcla de reacción así obtenida se incuba después, preferentemente durante tiempos comprendidos entre 3 y 5h, en particular 4h, a temperaturas habitualmente comprendidas entre 30 y 40°C, preferentemente 37°C.

La mezcla de reacción se centrifuga después, preferentemente, y se procede a una medición de la radioactividad de la solución incubada según unos dispositivos apropiados disponibles en el comercio. La radioactividad medida de la solución es proporcional al porcentaje de hemólisis de los hematíes tratados y, en consecuencia, al contenido en anticuerpos anti-A y anti-B.

40

A título de ejemplo, los porcentajes de hemólisis de los hematíes de los grupos sanguíneos A, B y AB obtenidos considerando un concentrado de IgG de la invención (B3) y un concentrado de IgG de la técnica anterior (C1) que tiene unos porcentajes de hemólisis más débiles entre los concentrados disponibles en el comercio, se indican en la tabla 2 siguiente.

45

Tabla 2

Porcentaje de hemólisis hematíes (%)	B3	C1 (técnica anterior)
Grupo A	6	13
Grupo B	5	11
Grupo AB	6	13

50 Los ejemplos siguientes ilustran unos modos de realización de la presente invención, sin limitar, no obstante, su alcance.

Ejemplo 1

55 Una muestra de concentrado de IgG a 40 g/l (B2) se obtiene mediante la realización del procedimiento descrito en el documento WO 02/092632.

Una columna cromatográfica de 50 cm de longitud y de 44 mm de diámetro se lleva con una mezcla 50/50 (v/v) de soporte GLYCOSORB ABO<sup>®</sup> injertado por unos trisacáridos que corresponden a los epítomos del grupo sanguíneo A y del grupo sanguíneo B, después se somete a una etapa previa de lavado mediante 1200 ml de agua.

60

Un concentrado de IgG B2 a razón de 0,2 l/ml de soporte a través de una bomba. Una vez que este volumen se ha percolado a través de la columna, ésta se lava mediante un volumen mínimo de agua para la preparación inyectable (PPI) a fin de recuperar las IgG presentes en el volumen muerto de la columna.

- 5 Se recupera un concentrado de IgG B3 a aproximadamente 40 g/l empobrecido en AcaA, AcaB y en IgG polirreactivas que se somete a una ultrafiltración de manera que el concentrado esté a 60 g/l y a una nanofiltración de eliminación de virus sobre tres filtros dispuestos en serie y de umbral de retención decreciente de 100, 50 y 20 nm.
- 10 La disolución de los excipientes estabilizantes constituidos de una mezcla de glicina a 7 g/l, de manitol a 30 g/l y de 20 ppm de Tween® 80 en el concentrado de IgG a 60 g/l se prosigue de un ajuste de la concentración en IgG a 50 g/l mediante agua PPI, después el concentrado se filtra estérilmente y se reparte en frascos.

Ejemplo 2: Cuantificación de los anti-A/B en las IgIV

- 15 1) Principio de ensayo:
- 1-1) Preparación de los hematíes humanos
- 20 Las suspensiones de hematíes humanos de grupo A rhesus +, B rhesus + o O rhesus + se normalizan a la concentración de  $40 \times 10^6$  hematíes/ml en un tampón PBS + 1 % BSA a pH = 7,4.
- 1-2) Preparación de la gama de anti-D monoclonal
- 25 Se dosifica una preparación de anti-D monoclonal (denominado R297) en Densidad Óptica (DO) a 280nm frente a su tampón de PBS, de pH 7,4. El coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de la proteína se calcula con respecto a su composición en diferentes aminoácidos y la concentración (C) en anti-D monoclonal se obtiene aplicando la fórmula  $C = DO/EI$  con l = ancho de la cuba para efectuar la medición de la DO.
- 30 Un intervalo de 0 a 200 ng/ml de anticuerpo monoclonal anti-D se realiza en 12 puntos (200; 150; 100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 y 0 ng/ml).
- 1-3) Preparación de las soluciones de inmunoglobulinas
- 35 Se han estudiado diferentes inmunoglobulinas intravenosas, disponibles en el comercio. Las características principales de estas inmunoglobulinas se detalla en la tabla siguiente:

Designación	Proveedor	Concentración
Inmunoglobulina polivalente	A	50 g/l
Inmunoglobulina polivalente	B	50 g/l
Inmunoglobulina humana intravenosa al 10%	C	100 g/l
IgNG 2 (*)	LFB	50 g/l
IgNG 1 (**)	LFB	50 g/l
TEGELINE®	LFB	50 g/l

\* realizadas mediante la realización del procedimiento descrito en el documento WO 02/092632 seguido de la etapa de inmuoafinidad descrita en el ejemplo 1

\*\* realizadas mediante la realización del procedimiento descrito en el documento WO 02/092632, sin etapa de inmuoafinidad tal como se ha descrito en el ejemplo 1

- 40 Las diferentes preparaciones de inmunoglobulinas se ajustan a la concentración de 1 mg/ml mediante un tampón PBS + 1 % BSA a pH=7,4.

1-4) Sensibilización de los hematíes

En una micro placa de fondo redondo, se depositan en los pocillos:

- 45 - 50  $\mu$ l de la suspensión de hematíes A rhesus +, B rhesus + o O rhesus + a  $40 \times 10^6$  hematíes/ml,  
- 50  $\mu$ l del intervalo anti-D o 50  $\mu$ l de las muestras (IgIV) a analizar.

- 50 Las muestras a evaluar se depositan en triplicado.

Las placas se incuban después durante 2 horas a 37°C bajo agitación.

1-5) lavados

Las placas se centrifugan durante 1 minuto a 770 g. El sobrenadante se separa por vuelco y después se añaden 200  $\mu$ l de PBS + 1% BSA en cada pocillo. La operación se renueva 3 veces.

5 1-6) Adición del conjugado y lavados

Se diluye un F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humanas (Fc específico) marcado con ficoeritrina (PE) (Beckman Coulter Ref: PN IM0550) al 1/20 en el tampón PBS + 1% BSA pH=7,4, después se depositan 50  $\mu$ l de la solución en cada pocillo. La placa se incuba después durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. Se realizan 3 lavados sucesivos tales como se describen en el párrafo 1-5).

1-7) Lectura de la citometría de flujo

Las suspensiones de hematíes se leen en el citómetro de flujo (Beckman Coulter FC500) según un programa apropiado. La lectura se efectúa sobre 50 000 eventos y el aparato calcula automáticamente la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada punto de calibración o muestra.

1-8) Interpretación de los resultados

El IMF se obtiene en función de la concentración en anticuerpo monoclonal anti-D y la ecuación de la recta de regresión se obtiene mediante el programa Excel. Después, para cada muestra, la concentración en equivalente anticuerpo anti-D se obtiene utilizando la ecuación lineal de la recta de regresión. Puesto que las muestras se ensayaron por triplicado, la media de concentración y el coeficiente de variación se calcula mediante el programa Excel.

2) Resultados:

2-1) Concentración en anticuerpo anti-A

Nombre	Hematíes O rhesus +	Hematíes A rhesus + (ng Ig anti-A/mg de Ig)	CV (%)
Inmunoglobulina polivalente, A	ns	55,4	4,5
Inmunoglobulina polivalente, B	ns	44,4	3,4
Inmunoglobulina humana intravenosa al 10%, C	ns	117,9	14,6
IgNG 2	ns	22,2	5,5
IgNG 1	ns	119,8	4,9
TEGELINE	ns	35,6	5,0
ns = no significativo			

2-2) Concentración en anticuerpo anti-B

Nombre	Hematíes O rhesus +	Hematíes B rhesus + (ng Ig anti-B/mg de Ig)	CV (%)
Inmunoglobulina polivalente, A	ns	64,0	0,9
Inmunoglobulina polivalente, B	ns	42,4	5,1
Inmunoglobulina humana intravenosa al 10%, C	ns	89,0	20,5
IgNG 2	ns	16	9,9
IgNG 1	ns	155,2	4,8
TEGELINE	ns	44,2	8,0
ns = no significativo			

3) Conclusiones:

La etapa de afinidad es realmente contributiva para la eliminación de los anticuerpos anti-A y anti-B. Entre diferentes inmunoglobulinas estudiadas presentes en el mercado, el producto IgNG2 es el producto que contiene menos anticuerpos anti-A y anticuerpos anti-B.

Ejemplo 3

Se prepara una suspensión de hematíes al 1% (v/v) del grupo sanguíneo A en un tampón PBS, de pH 7,4, que contiene un 1% en peso de suero albúmina bovina BSA. Se extraen 50  $\mu$ l de la suspensión de hematíes y se introducen en un tubo para un citómetro de flujo Beckmann-Coulter Epics XL, así como 50  $\mu$ l de una solución de marcador interno que mide el flujo. La suspensión se calibra a 40.10<sup>6</sup> hematíes/ml.

## ES 2 690 664 T3

5 Se preparan ocho lotes de soluciones de IgG por dilución sucesiva de un factor 2 del concentrado de IgG (v/v) (B3) obtenido en el ejemplo 1, siendo el lote más concentrado a 30 g/l, el más diluido a 0,234 g/l. Se coloca después un volumen de 50  $\mu$ l de la suspensión en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos, después 50  $\mu$ l de las diferentes soluciones de IgG diluidas.

Se pone a incubar el conjunto durante 2h a una temperatura de 37°C, bajo agitación.

10 Cada pocillo se lava después con 200  $\mu$ l de tampón PBS que contiene el BSA anterior y la microplaca se centrifuga durante 1 minuto a 2000 rpm. Después de la eliminación del sobrenadante, se añaden en cada pocillo 50  $\mu$ l de una solución diluida a 1/20 por PBS-BSA de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> de cabra anti-IgG humanas marcadas de fluorocromo de ficoeritrina (Beckmann Coulter).

15 La incubación del conjunto se lleva a cabo durante 30 min fuera de la luz.

La suspensión así obtenida se lava después como anteriormente.

20 El residuo de cada pocillo se recoge mediante 100  $\mu$ l de PBS-BSA. El volumen contenido en cada pocillo de la microplaca se transfiere en un tubo en el que se añaden después 500  $\mu$ l de líquido de revestimiento Isoflow (Coulter) y se somete a una citometría de flujo llevada a cabo con el dispositivo Coulter-Beckmann Epics XL que comprende unos programas de adquisición de datos y de explotación de los resultados. La fluorometría se mide para cada muestra.

25 Se procede de la misma manera con los hematíes de grupo sanguíneo B.

Este modo de realización se lleva a cabo con tres lotes diferentes de IgG (B3) y se aplica también a tres lotes diferentes de IgG preparados por fraccionamiento etanólico según el método de Cohn (citado anteriormente) (B1).

30 Los resultados obtenidos aparecen en la tabla 3 siguiente.

Tabla3

Muestras	Título en anticuerpo anti-A	Título en anticuerpo anti-B
B1	1	1
B2 (3 lotes)	3,80; 3,55; 3,59	3,80; 4,45; 3,31
B3 (3 lotes)	0,66; 0,68; 0,69	0,33; 0,73; 0,50

### Ejemplo 4

35 Se prepara una suspensión de hematíes tratados con papaína al 1% (v/v) del grupo sanguíneo A, B, AB u O y se cuenta después en una célula de Malassez para obtener 10<sup>6</sup> hematíes. Se añaden 100  $\mu$ Ci de <sup>51</sup>Cr (1 volumen para 1 volumen de hematíes). Se incuba el conjunto durante 1 hora y los hematíes radiomarcados se lavan después 5 veces.

40 Los hematíes radiomarcados se ponen después en contacto con unas muestras de concentrados de IgG (B2) obtenidos en el ejemplo 1, a una concentración de 1,2 mg/ml para 5.10<sup>6</sup> hematíes radiomarcados, en un volumen de 100  $\mu$ l.

45 Un volumen idéntico al anterior de 100  $\mu$ l de suero normal de grupo sanguíneo AB se añade después a la mezcla anterior para aportar los diferentes factores del complemento.

La mezcla de reacción así obtenida se incuba después, 4h, a una temperatura de 37°C.

50 La mezcla de reacción se centrifuga después durante 1 minuto a 2000 rpm, y se procede a una medición de la radioactividad de la solución sobrenadante incubada, según unos dispositivos apropiados disponibles en el comercio. La radioactividad medida de la solución es proporcional al porcentaje de hemólisis de los hematíes tratados, y en consecuencia el contenido en anticuerpo anti-A y anti-B.

55 Se procede de manera idéntica con los hematíes de los grupos sanguíneos B, AB y O, siendo todo de rhesus +, y con una muestra de suero del grupo O+. Este modo de realización se lleva a cabo con tres lotes diferentes de IgG (B2).

60 Además, se aplica el procedimiento a tres lotes de muestras comerciales de concentrados de IgG, marcados como C2 a C4, y una muestra C5 de suero del grupo O+, incluido como control negativo.

La radioactividad medida de la solución es proporcional a los porcentajes de hemólisis de los hematíes tratados y, por lo tanto, a la cantidad en anticuerpos anti-A y anti-B fijados sobre los hematíes.

Los resultados de hemólisis obtenidos se presentan en la tabla 4 siguiente.

5

Tabla 4

Porcentaje de hemólisis de hematíes (%)	B3	C2	C3	C4	C5
Grupo A+	6	16	13	30	34
	6,2	15,5	13,5	31	34,4
	6,5	16,3	13,2	31	34,6
Grupo B+	5	13,1	11,2	25	34
	4,8	13,3	10,8	25,3	34,4
	5,4	13,4	10,9	25,4	34,6
Grupo AB+	6	16	15,1	31	34
	5,9	15,7	15,1	31,4	34,4
	6,5	16,3	15,4	30,9	34,6
Grupo O+	0,1	0,2	0,22	0,33	2
	0,15	0,25	0,24	0,32	2,2
	0,12	0,21	0,24	0,30	2,7

10 Los resultados obtenidos muestran que el concentrado de IgG B3 que se ha sometido a una cromatografía de afinidad según la invención contiene la más baja cantidad en AcaA y AcaB dado que el porcentaje de hemólisis de los hematíes que provienen de diferentes grupos sanguíneos es el más bajo.

No se observa hemólisis con unos hematíes de fenotipo O+, incluido como control negativo.

15 Ejemplo 5

Medición de la polirreactividad de los concentrados IgG B2 (antes de la cromatografía de afinidad) y después de esta cromatografía (concentrado de IgG B3) descrita en el ejemplo 1.

20 La medición de la polirreactividad de estos concentrados de IgG se efectúa según la patente EP 1 059 088 utilizando dos antígenos que reaccionan con las IgG polirreactivas. Se trata de la miosina y de la albúmina modificada por unos grupos dinitrofenilo (Albúmina DNP).

25 La tabla 5 presenta los factores de enriquecimiento de las IgG polirreactivas de las muestras B2, B3 y C4 del ejemplo 3 cuyo contenido en IgG se ha fijado arbitrariamente a 1, a título de referencia.

Estas mediciones se han efectuado sobre tres lotes diferentes de concentrados de IgG considerados.

Tabla 5

Muestra	Miosina	Albúmina DNP
B1	1	1
B2 (3 lotes)	1,2; 0,8; 1,2	3,2; 1,0; 2,0
B3 (3 lotes)	0,4; 0,4; 0,4	1,0; 1,0; 1,0
C4 (3 lotes)	2,0; 2,0; 2,0	8,0; 6,0; 7,0

30 Los resultados indican que el concentrado de IgG B3 de la invención contiene de 5 a 8 veces menos de IgG polirreactivas que el concentrado de la técnica anterior C4.

Ejemplo 6

35 Ejemplo comparativo sobre la eficacia de los concentrados IgG (B3) empobrecidos en AcaA, AcaB, y en IgG polirreactivas, con concentrados de IgG (B1).

40 El estudio ha tenido lugar sobre unos ratones deficientes en receptores FcγRI y FcγRIII tratados en la perspectiva de evaluación de la actividad inmunomoduladora de los concentrados de IgG según la invención. Estos animales sirven de modelo para púrpura trombocitopénica.

Se utiliza como control un concentrado de IgG (B1) obtenido por fraccionamiento etanólico según Cohn.

45 Se aplica el protocolo experimental descrito por Teeling J.L *et al.* (Blood, 15/08/2001, vol. 98, número 4, p.1095-1099).

## ES 2 690 664 T3

Las plaquetas, destruidas por inyección de IgG monoclonales antiplaquetas de  $9 \cdot 10^8/\text{ml}$  a nivel de  $2 \cdot 10^8/\text{ml}$ , suben a  $7 \cdot 10^8/\text{ml}$  en los animales tratados por las concentraciones de IgG B1 y B3 a una dosis terapéutica de 1 g/kg.

5 La actividad inmunomoduladora del concentrado de IgG B3 según la invención no se ha modificado mediante la realización de la cromatografía de inmutafinidad.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Concentrado terapéutico de inmunoglobulinas G (IgG), caracterizado por que presenta unos contenidos respectivos en anticuerpos anti-A y anti-B conformes a un resultado negativo al ensayo de Coombs indirecto *in vitro*, a la dilución 1/64, llevado a cabo con una solución de IgG de concentración inicial llevada a 30g/l y un contenido de IgG polirreactivas residuales comprendido entre el 0,01% y el 0,1%, con respecto al contenido total de IgG, midiéndose dicho contenido en IgG polirreactivas residuales por ELISA utilizando el antígeno albúmina modificado por unos grupos dinitrofenilo (Albúmina DNP).
- 10 2. Concentrado de inmunoglobulinas G según la reivindicación 1, que comprende un contenido en anticuerpo anti-A no superior a 23 ng/mg de IgG, y un contenido en anticuerpo anti-B no superior a 20 ng/mg de IgG.
- 15 3. Concentrado de inmunoglobulinas G según la reivindicación 1 o 2, que presenta además un contenido de IgG polirreactivas residual comprendido entre el 0,07 y el 0,1%, con respecto al contenido total en IgG.
- 20 4. Concentrado según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende unos estabilizantes destinados a permitir el almacenamiento de dicho concentrado, representando dichos estabilizantes una mezcla de un azúcar alcohólico, preferiblemente el manitol o el sorbitol, de glicina y de un detergente no iónico.
5. Concentrado según una de las reivindicaciones 1 a 4, inyectable por vía intravenosa.