

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 435**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

B01D 15/38 (2006.01)

B01D 15/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2016 E 16187837 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3141557**

54 Título: **Métodos de evaluación de la calidad de medios adecuados para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B**

30 Prioridad:

08.09.2015 US 201562215431 P

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

25.03.2019

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
Frankfurter Strasse 250
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**RAHANE, SANTOSH;
TURIANO, MATTHEW;
BIAN, NANYING y
STONE, MATTHEW T.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 705 435 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

Métodos para la evaluación de la calidad de medios adecuados para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. 62/215.431, fecha de presentación 8 de septiembre de 2015.

Antecedentes

10 El plasma humano enriquecido en inmunoglobulinas se utiliza para el tratamiento de muchos trastornos, así como para tratar ciertas deficiencias congénitas. Típicamente, el plasma humano se obtiene agrupando el plasma de múltiples donantes, con diferentes tipos de grupos sanguíneos. Los tipos de grupos sanguíneos se pueden dividir en 4 tipos principales. Grupo sanguíneo tipo A - tiene solo el antígeno A en los glóbulos rojos (y el anticuerpo B en el plasma); grupo sanguíneo tipo B - que tiene solo el antígeno B en los glóbulos rojos (y el anticuerpo A en el plasma); grupo sanguíneo tipo AB - tiene antígenos A y B en los glóbulos rojos (pero ni el anticuerpo A ni el B en el plasma); y grupo sanguíneo tipo O - no tiene antígenos A ni B en los glóbulos rojos (pero los anticuerpos A y B están en el plasma).

15 Es importante que los glóbulos rojos de una persona que tenga un antígeno tipo de un grupo sanguíneo concreto, tal como A, nunca entren en contacto con los anticuerpos que se unirán a este antígeno, tales como los anticuerpos anti-A, porque el contacto con tales anticuerpos daría como resultado la aglutinación y o hemólisis de sus glóbulos rojos que pueden incluso causar la muerte. Por lo tanto, un receptor que tenga un grupo sanguíneo tipo A solo puede recibir plasma de un donante que tenga un grupo sanguíneo tipo A o un grupo sanguíneo tipo AB; un receptor que tenga un grupo sanguíneo tipo B solo puede recibir plasma de un donante que tenga un grupo sanguíneo tipo B o un grupo sanguíneo tipo AB; un receptor que tenga un grupo sanguíneo AB solo puede recibir plasma de un donante que tenga un grupo sanguíneo tipo AB; y un receptor que tiene un grupo sanguíneo tipo O se considera un receptor universal. La compatibilidad de los diferentes tipos de grupos sanguíneos es importante para el desarrollo de transfusiones de sangre y trasplantes de órganos seguros. Sin embargo, en el caso de los fármacos terapéuticos derivados de la sangre que dependen de la agrupación de plasma sanguíneo de un gran número de personas, resulta particularmente difícil garantizar que un receptor no reciba plasma no compatible.

20 Se han desarrollado varios enfoques para eliminar selectivamente los anticuerpos del tipo de grupo sanguíneo del plasma, incluidos los glóbulos rojos tratados con calor y formalina (Vox Sang., 1967, 12, 75-77), O₈₆:B7 de Escherichia coli tratado con calor que tiene antígenos A y B (Transfusion, 1972, 12, 98-102.), polvo de estroma de glóbulos rojos, sustancias inmunoabsorbentes derivadas de antígeno de estroma de glóbulos rojos (Chemical Soc. Rev., 1978, 7, 423-452), y sustancias inmunoabsorbentes sintéticas de los grupos sanguíneos A y B (Rev. Fr. Transfus. Immunohematol. 1981, 24, 3, 281-287).

25 Se han desarrollado sustancias inmunoabsorbentes para cromatografía en fase sólida como medios de cromatografía comerciales para el tratamiento de productos derivados de la sangre y también para la preparación de donantes antes del trasplante a un receptor incompatible con ABO. Una de las ventajas clave de emplear sustancias inmunoabsorbentes sintéticas es que se construyen sintéticamente en lugar de obtenerse de fuentes naturales y, por lo tanto, tienen propiedades más uniformes de un lote a otro.

30 Actualmente, algunos de los medios de cromatografía disponibles comercialmente con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A (antígeno A) y/o ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B (antígeno B) incluyen el dispositivo Glycosorb-ABO (Glycorex Transplantation AB). Este dispositivo Glycosorb se utiliza para preparar donantes de órganos para el trasplante a pacientes que tienen tipos de sangre incompatibles. Los ligandos antigénicos del grupo sanguíneo en el dispositivo Glycosorb-ABO se unen y eliminan los anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo A (anti-A) y los anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo B (anti-B) de la sangre de los donantes de órganos, lo que reduce el riesgo de rechazo del órgano.

35 Uno de los principales desafíos en la utilización de medios de cromatografía para la purificación de productos derivados de la sangre es la falta de un método eficaz y reproducible para evaluar la calidad relativa de diferentes medios, p. ej., diferentes lotes del mismo tipo de medios o medios de diferentes fuentes o muestras de los mismos medios a lo largo del tiempo.

Compendio

40 Las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a métodos para evaluar la calidad de un medio de cromatografía que contiene un ligando antigénico del grupo sanguíneo A o un ligando antigénico del grupo sanguíneo B. Los métodos descritos en la presente memoria son especialmente útiles para valorar o evaluar la calidad del mismo tipo de medios de un lote a otro, durante y después de su uso y para optimizar los medios durante su desarrollo.

45 En algunas realizaciones, se proporciona un método para comparar la calidad de dos o más muestras de medios de

5 cromatografía de afinidad, que contienen ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A anclados a un soporte sólido, donde el método comprende las etapas de: (a) proporcionar dos o más muestras de medios de cromatografía de afinidad, cada una de volumen VR; (b) incubar cada muestra con una solución de Lectina de *Helix pomatia* (HP) purificada de concentración C1 y volumen VM conocidos; (c) obtener un sobrenadante para cada una de las muestras y medir la concentración C2 de la Lectina HP purificada en cada sobrenadante; determinar la capacidad de unión estática de cada una de las muestras de medios de cromatografía de afinidad utilizando la siguiente ecuación.

$$\frac{[C1-C2] \times VM}{VR}$$

VR

10 en donde las capacidades de unión estática de las muestras de medios para la Lectina HP se correlacionan con su capacidad para eliminar anticuerpos anti-A de una muestra, proporcionando así una comparación de la calidad de las dos o más muestras de medios de cromatografía de afinidad diferentes.

15 En otras realizaciones, se proporciona un método para comparar la calidad de dos o más muestras de medios de cromatografía de afinidad, cada uno de los cuales contiene ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B anclados a un soporte sólido, donde el método comprende las etapas de: (a) proporcionar dos o más muestras de medios de cromatografía de afinidad, cada uno de volumen VR; (b) incubar cada muestra con una solución de Lectina IsoLectina B4 de *Griffonia simplicifolia* (GSI-B4) purificada de concentración C1 y volumen VM conocidos; (c) obtener un sobrenadante para cada una de las muestras y medir la concentración C2 de Lectina GSI-B4 purificada en cada sobrenadante; determinar la capacidad de unión estática de cada una de las muestras de medios de cromatografía de afinidad utilizando la siguiente ecuación.

$$\frac{[C1-C2] \times VM}{VR}$$

VR

20 en donde las capacidades de unión estática de las muestras de medios para Lectina GSI-B4 purificada se correlaciona con su capacidad para eliminar anticuerpos anti-B de una muestra, proporcionando así una comparación de la calidad de dos o más muestras de medios de cromatografía de afinidad.

25 Una muestra de medios con mayor capacidad de unión para Lectina HP o Lectina GSI-B4, con respecto a otras muestras con las que se compara, es de mejor calidad en comparación con las otras muestras de medios.

30 En algunas realizaciones de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria, el soporte sólido es un soporte sólido polimérico poroso o no poroso que comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliviniléter, poli(alcohol vinílico), polimetacrilato, poliacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilamida y policarbonato. En una realización concreta, el soporte sólido es un soporte sólido con una base de poliviniléter. En algunas realizaciones, el soporte sólido está en forma de esfera (p. ej., una esfera con una base de poliviniléter).

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, las diferentes muestras de medios de cromatografía de afinidad constituyen diferentes lotes del mismo tipo de medios.

35 En otras realizaciones, las diferentes muestras de medios de cromatografía de afinidad constituyen los mismos medios en diferentes fases de uso.

En algunas realizaciones, los medios son capaces de eliminar anticuerpos anti-A o anti-B de una muestra seleccionada del grupo que consiste en sangre, hemoderivados, plasma, derivados de plasma y alimentación de IGIV.

40 En algunas realizaciones, la concentración de Lectina HP o Lectina GSI-B4 en el sobrenadante se mide utilizando la absorbancia a 280 nm.

45 En la presente memoria también se proporcionan métodos para evaluar la calidad de un medio de cromatografía de afinidad que contiene un ligando antigénico del grupo sanguíneo A o un ligando antigénico del grupo sanguíneo B anclado a un soporte sólido, después de la exposición de los medios de cromatografía de afinidad a condiciones ácidas o alcalinas, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar un medio de cromatografía que tiene ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A o ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B anclados a un soporte sólido; (b) medir la capacidad de unión de los medios para una Lectina HP purificada en el caso de los medios con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A o para una Lectina GSI-B4 purificada en el caso de los medios con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B; (c) exponer el medio a condiciones ácidas o alcalinas durante al menos 5 horas; y (d) medir la capacidad de unión de los medios para la Lectina HP purificada en el caso de los medios con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A o para la Lectina GSI-B4 purificada en el caso de los medios con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B; en donde una reducción en la capacidad de unión de los medios en la etapa (d) con respecto a la etapa (b) indica que la calidad de los medios se ha reducido después de la exposición a condiciones ácidas o alcalinas.

Las realizaciones descritas en la presente memoria también se pueden utilizar para determinar si un medio

comprende ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A o ligandos antigénicos del grupo B, donde el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio, en el que se desconoce si el medio comprende ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A o ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B; (b) medir la capacidad de unión de los medios desconocidos para Lectina HP purificada y por separado para Lectina GSI-B4 purificada; y (c) comparar la capacidad de los medios desconocidos para Lectina HP purificada y Lectina GSI-B4 purificada; donde se determina que los medios desconocidos comprenden los ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A, si tiene una mayor capacidad de unión para la Lectina HP con respecto a la capacidad de unión para la Lectina GSI-B4, y se determina que los medios desconocidos comprenden los ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B si tiene una mayor capacidad de unión para la Lectina GSI-B4 con respecto a la capacidad de unión para la Lectina HP.

10 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un ligando oligosacárido representativo, que se une a anticuerpos anti-antígeno A.

La Figura 2 es un ligando oligosacárido representativo, que se une a anticuerpos anti-antígeno B.

Descripción detallada

15 Recientemente, ha habido un mayor interés en la aplicación de medios sintéticos de cromatografía inmunoabsorbente para la eliminación de IgG anti-A y anti-B de la inmunoglobulina intravenosa (IGIV), que consiste en anticuerpos IgG polivalentes concentrados extraídos de plasma reunido obtenido de varios donantes de sangre, a veces hasta mil o más que mil donantes de sangre. Durante el procedimiento de purificación de la IgG del plasma sanguíneo, los anticuerpos IgM anti-A y anti-B más grandes se pueden separar típicamente de los anticuerpos IgG más pequeños por fraccionamiento. Sin embargo, algunos porcentajes de los anticuerpos anti-A y anti-B están generalmente en forma de IgG que no se puede distinguir de los otros anticuerpos IgG solo por fraccionamiento. Por lo tanto, los concentrados terapéuticos de IGIV se escrutan típicamente utilizando un ensayo de aglutinación para controlar las concentraciones de anticuerpos IgG anti-A y anti-B para prevenir la administración de IGIV con altas concentraciones de anticuerpos anti-A y anti-B IgG. Sin embargo, a pesar de esta precaución, se sabe que aún ocurren reacciones hemolíticas que pueden llevar a la muerte a aquellos receptores que tienen tipos de grupos sanguíneos A, B o AB (Transcripción de "Strategies to address hemolytic complications of immune globulin infusions", "FDA Center for Biologics Evaluation and Research Public Workshop Washington, D.C., 28-29 de enero de 2014).

20 Los ensayos de aglutinación comunes se basan en el uso de glóbulos rojos vivos, que tienen vidas útiles limitadas y la densidad de los antígenos en la superficie celular generalmente varía de un lote a otro. La aglutinación también requiere diluciones seriadas y se basa en una evaluación cualitativa (observaciones visuales o microscópicas) de la aglutinación celular. Un método más preciso para determinar las concentraciones de anticuerpos anti-A y anti-B emplea la citometría de flujo. Sin embargo, los métodos de citometría de flujo también utilizan glóbulos rojos vivos y son significativamente más complejos y consumen más tiempo que los ensayos de aglutinación. También se ha informado de que los ensayos ELISA miden la concentración de anticuerpos anti-A y anti-B, sin embargo, esta técnica requiere un procedimiento de múltiples etapas relativamente complejo y reactivos antigénicos especializados.

30 Como se comentó anteriormente, los medios inmunoabsorbentes para cromatografía que contienen ligandos que se unen a anticuerpos anti-A o anti-B se consideran eficaces para la eliminación de tales anticuerpos de productos derivados de la sangre, p. ej., plasma e IGIV. Sin embargo, en la actualidad, no se encuentran disponibles buenos métodos que se puedan utilizar para calificar y validar tales medios, a fin de evaluar su reproducibilidad y confiabilidad.

35 Es especialmente importante evaluar la calidad de lote a lote de los medios de cromatografía de ligando antigénico de grupo sanguíneo para garantizar que los medios cumplan con las especificaciones de producción y los requisitos de calidad durante toda su vida útil. Además, también es importante evaluar tales medios durante y después del uso, limpieza y desinfección para asegurarse de que conservan la capacidad de eliminar las impurezas deseadas después de los procedimientos de uso, limpieza y desinfección. La capacidad de los medios con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo para unirse a sus moléculas diana previstas generalmente se ha evaluado directamente midiendo la reducción en la concentración de anticuerpos antigénicos policlonales del grupo sanguíneo en productos derivados de la sangre antes y después del contacto con los medios con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo.

40 Como demuestran los ejemplos en la presente memoria, la capacidad de los medios con ligando antigénico anti-A y anti-B para ciertas Lectinas purificadas se correlaciona con la capacidad de tales medios para eliminar anticuerpos anti-A o anticuerpos anti-B, según sea el caso, de un muestra (p. ej., una alimentación de IGIV).

45 La medición de la capacidad de los medios que contienen ligando antigénico del grupo sanguíneo para una molécula purificada (p. ej., una Lectina purificada en este caso) tiene varias ventajas sobre los métodos descritos anteriormente, que se basan en gran medida en la medición de la eliminación de anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo de los productos sanguíneos, que lleva tiempo y es difícil de reproducir. En contraste, las realizaciones descritas en la presente memoria se basan en la medición de la capacidad de unión para una molécula purificada

que puede realizarse de manera más eficaz y reproducible en comparación con los métodos convencionales conocidos en la técnica.

5 Las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a un nuevo método para evaluar la calidad de los medios con ligandos antigénicos de grupos sanguíneos que puede realizarse de manera más eficaz y reproducible en comparación con los métodos convencionales conocidos en la técnica. Los métodos descritos en la presente memoria tienen varias ventajas sobre los métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, no solo los métodos descritos en la presente memoria son más eficaces, directos y fácilmente reproducibles en comparación con los ensayos basados en aglutinación más comúnmente utilizado, sino que los métodos descritos en la presente memoria no requieren ningún equipo especializado (p. ej., para citometría de flujo) o ningún reactivo antigénico de grupo sanguíneo especializado (p. ej., para ensayos basados en ELISA).

10 Como lo demuestran los Ejemplos en la presente memoria, la capacidad de los medios con ligando antigénico anti-A y anti-B para una Lectina purificada se correlaciona con la capacidad de los medios para eliminar los anticuerpos del grupo sanguíneo A o los anticuerpos del grupo sanguíneo B, según sea el caso, de una alimentación de IGIV. Los métodos proporcionados en la presente memoria se basan en la medición de la capacidad de unión de tales medios para Lectinas purificadas y son fáciles de realizar, requieren menos tiempo y son mucho más confiables y reproducibles que los métodos existentes conocidos en la técnica.

15 D. Müller-Schulte et al., en Journal of Chromatography, 539 (1991) 307-314) describen un método para comparar la unión de los anticuerpos del grupo sanguíneo A de suero humano a diversos medios de cromatografía. La medición de la capacidad de unión de los medios antigénicos del grupo sanguíneo para Lectinas purificadas tiene varias ventajas sobre los métodos existentes. Por ejemplo, en comparación con la aglutinación, que se basa en glóbulos rojos vivos que tienden a mostrar mucha variabilidad de un lote a otro y también en las observaciones subjetivas de aglutinación por parte del operario, el uso de Lectinas purificadas reduce o elimina los errores en gran medida y también proporciona resultados uniformes.

20 Las Lectinas son proteínas naturales que se unen a los carbohidratos y son capaces de aglutinar células. Se sabe que las Lectinas muestran especificidad por los tipos de sangre humana y causan aglutinación preferente de células malignas en condiciones fisiológicas. Hasta la fecha, se han identificado y extraído aproximadamente 400 Lectinas de fuentes vegetales y animales. [Sharon, N. y Lis, H., Lectins, 2ª ed.; Springer Publications, Países Bajos, 2007].

25 Se ha informado anteriormente de que varias Lectinas, incluyendo las Lectinas de *Griffonia Simplicifolia* (GS-I), *Griffonia simplicifolia* - IsoLectin B4 (GSI-B4), y *Helix pomatia* (HP), exhiben especificidad de unión para antígenos del grupo sanguíneo. [Matsui, T. et al, Biochim. et. Biofis Acta, 1525, 2001, 50-57].

30 La Tabla 1 resume las Lectinas, sus fuentes y las especificidades hacia los antígenos del grupo sanguíneo.

Tabla 1. Lectinas específicas del grupo sanguíneo, fuentes y especificidades del grupo sanguíneo

Lectina	Especies de origen	Especificidad del grupo sanguíneo
Lectina de Helix Pomatia (HPA)	<i>Helix pomatia</i>	A
Lectina de Dolichos Biflorus (DBA)	<i>Dolichos biflorus</i>	A ₁ >A ₂
Lectina de Vicia Villosa (VVA)	<i>Vicia villosa</i>	A ₁
Lectina de Phaseolus Lunatus (LBA)	<i>Phaseolus lunatus</i>	A ₁ >A ₂ >>B
Lectina de Glicine Max (SBA)	<i>Glycine max</i>	A ₁ >A ₂ >>B
Lectina de Wistarita Floribunda (WFA)	<i>Wistarita floribunda</i>	A>B, O
IsoLectina de Griffinia Simplicifolia-B4 (GSI-B4)	<i>Griffonia simplicifolia</i>	B
Lectina de Euonymus Europaeus (EEE)	<i>Euonymus europaeus</i>	B, O (A ₂)
Lectina de Sophora Japonica (SJA)	<i>Sophora japonica</i>	B>A>>O
Lectina de Ulex Europaeus (UEA-I)	<i>Ulex europaeus</i>	O
Lectina de Lotus Tetragonolobus (LTA)	<i>Lotus tetragonolobus</i>	O

Si bien varias Lectinas se identifican como específicas del grupo sanguíneo, muy pocas están disponibles comercialmente. Por ejemplo, se ha informado de que las Lectinas HP y GSI-B4 disponibles comercialmente tienen especificidad de unión para el antígeno del grupo sanguíneo A y el antígeno del grupo sanguíneo B, respectivamente. En contraste, se ha informado de que la Lectina GS-I exhibe especificidad de unión para los antígenos del grupo A y B. Estas Lectinas tienen aproximadamente el mismo tamaño que los anticuerpos IgG monoméricos (~150 kDa) y se espera que exhiban propiedades de transferencia de masa similares a las de los anticuerpos IgG monoméricos; sin embargo, son muy diferentes en su estructura y composición general.

A pesar de las diferencias inherentes en el tipo y la fuente de las moléculas de Lectina e IgG, se observó en la presente memoria que las capacidades de unión estática de los medios con antígeno del grupo sanguíneo A y antígeno del grupo sanguíneo B para ciertas Lectinas purificadas se correlacionan con su capacidad para eliminar los anticuerpos anti-A y anti-B de una muestra, p. ej., una alimentación de IGIV. Se encontró que el porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B de una alimentación de IGIV es el más alto para aquellos medios que tenían las capacidades de unión más altas para las Lectinas HP y GSI-B4, respectivamente. En particular, la medición de la capacidad de unión estática de un medio para Lectinas es mucho más rápida y menos compleja que el procedimiento de citometría de flujo que se utiliza típicamente para medir la reducción en la concentración de anticuerpos anti-A y anti-B en una alimentación de IGIV.

Para que las realizaciones descritas en la presente memoria puedan entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de toda la descripción detallada.

I. Definiciones

El término "capacidad de unión" se refiere a la cantidad de una molécula que se une a un volumen definido de medios empaquetados en una columna y ejecutados en condiciones definidas. La capacidad de unión de los medios de cromatografía descritos en la presente memoria es la cantidad de anticuerpos anti-A o anti-B que los medios de cromatografía pueden unir por volumen de medio a una velocidad de flujo establecida.

En las realizaciones descritas en la presente memoria, se utiliza una Lectina purificada para evaluar la capacidad de unión de un medio de cromatografía adecuado para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B; y tal capacidad de unión se correlaciona con la capacidad de tales medios para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B. En otras palabras, la capacidad de unión de un medio de cromatografía para una Lectina purificada específica, como se describe en la presente memoria, se puede utilizar como un indicador para determinar la eficacia del medio para eliminar los anticuerpos anti-A o anti-B, según sea el caso. La capacidad de unión se puede medir como capacidad de unión estática o capacidad de unión dinámica. En una realización concreta, la capacidad de unión estática de los medios para ciertas Lectinas purificadas se mide en la presente memoria.

El término "capacidad de unión estática" de un medio (p. ej., un medio de cromatografía) se define como la cantidad de una proteína unida al medio dividida por el volumen del medio utilizado. Un método ilustrativo para medir la capacidad de unión estática de un medio de cromatografía es el siguiente. Después de poner en contacto el medio de cromatografía con la solución de proteína de concentración conocida, se deja incubar la solución con el medio para facilitar la unión de la proteína al medio de cromatografía. El tiempo de incubación puede variar (p. ej., de 5 minutos a 72 horas) y puede ser determinado fácilmente por un experto en la técnica, p. ej., midiendo la concentración de la proteína en el sobrenadante periódicamente (p. ej., midiendo la absorbancia a 280 nm) hasta que no haya un cambio medible en la concentración en el sobrenadante. Una vez que se alcanza el equilibrio entre la proteína unida al medio de cromatografía y la que está en solución, la concentración de la solución de proteína se mide una vez más en el sobrenadante. La capacidad de unión estática se mide a continuación por la cantidad inicial de proteína (antes de la incubación) menos la cantidad de proteína en el sobrenadante (después de la incubación) dividida por el volumen del medio utilizado.

La capacidad de unión estática de un medio de cromatografía concreto generalmente está influenciada por la composición de la solución de proteína que incluye uno o más de los siguientes factores, p. ej., la concentración de la proteína, la cantidad de medio de cromatografía utilizado, la concentración de otros componentes en la solución (sales, moléculas orgánicas, tampones), el pH de la solución y la conductividad. También puede estar influenciada por la temperatura de la solución de proteína. Todas estas variables generalmente se mantienen constantes para permitir la comparación de la capacidad de unión estática entre dos medios de cromatografía diferentes. El término "capacidad de unión estática" también se puede denominar "capacidad de unión de saturación" o "capacidad de unión máxima".

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, la capacidad de unión estática de un medio que contiene ligando antigénico del grupo sanguíneo A o ligando antigénico del grupo sanguíneo B para una molécula de Lectina purificada se utiliza como un indicio para predecir o evaluar su capacidad para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B, según sea el caso, de una muestra (p. ej., una alimentación de IGIV). La comparación de la capacidad de unión estática de dos lotes de medios diferentes o el mismo medio a lo largo del tiempo o medios de diferentes fuentes, es especialmente útil, ya que proporciona información sobre la calidad de los medios. En otras palabras, dado que la capacidad de unión de una molécula de Lectina purificada (Lectina HP en el caso de medios con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A o Lectina GSI-B4 en el caso de medios con ligandos antigénicos del grupo

sanguíneo B) se correlaciona con su capacidad para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B, según el caso, se puede utilizar la capacidad de unión para evaluar y comparar el rendimiento de diferentes lotes de un medio o el mismo medio a lo largo del tiempo o de medios de diferentes fuentes. Por consiguiente, utilizando los métodos descritos en la presente memoria, un experto en la técnica o un usuario final en la técnica pueden determinar fácilmente si un lote de medio muestra una pérdida en su rendimiento (es decir, la capacidad de eliminar anticuerpos anti-A o anti-B) sobre otro lote del mismo tipo de medio, o con el tiempo, especialmente después de la limpieza y desinfección repetidas. Adicionalmente, también se puede utilizar la medición de la capacidad de unión estática para una Lectina purificada para optimizar un medio durante el desarrollo.

En general, la capacidad de unión estática se puede calcular de la siguiente manera. Una muestra de medio de volumen VR se incuba con una solución de Lectina purificada de concentración conocida C1 y volumen conocido VM (Lectina HP en el caso de los medios con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A y Lectina GSI-B4 en el caso de los medios con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B); se obtiene un sobrenadante y la concentración de Lectina (HP o GSI-B4) C2 se mide en el sobrenadante; a continuación se calcula la capacidad de unión estática utilizando la siguiente ecuación.

$$\frac{[C1-C2] \times VM}{VR}$$

VR

El término "capacidad de unión dinámica" se define como la cantidad de una proteína que se une a una columna de cromatografía en condiciones de flujo en el punto en que la concentración de la solución de proteína que sale de la columna de cromatografía alcanza una cierta concentración, típicamente un porcentaje predeterminado de la concentración inicial. En la práctica, esto tiende a ser aproximadamente 10% de la concentración inicial. Esta masa de proteína se divide a continuación por el volumen de medio en la columna de cromatografía.

La capacidad de unión dinámica de un medio de cromatografía concreto generalmente está influenciada por la composición de la solución de proteína que incluye uno o más de los siguientes factores, p. ej., concentración de la proteína, concentración de otros componentes en la solución (sales, moléculas orgánicas, tampones), el pH de la solución, y la conductividad. La capacidad de unión dinámica también se puede ve influida por la temperatura a la que se carga la columna y por la velocidad de flujo a la que se carga la solución de proteína en la columna. La disminución de la velocidad de flujo de la solución de proteína en la columna de cromatografía aumenta la capacidad de unión dinámica que se mide. Por el contrario, el aumento de la velocidad de flujo de la solución de proteína en la columna de cromatografía disminuye la capacidad de unión dinámica que se mide. La capacidad de unión dinámica no debe exceder la capacidad de unión estática, ya que la capacidad dinámica de un medio de cromatografía está limitada por la tasa global de transferencia de masa.

El término "sobrenadante" se define como un líquido que está por encima de los medios de cromatografía sedimentados. La solución de sobrenadante se puede obtener permitiendo que los medios de cromatografía en una suspensión se depositen en el fondo de un recipiente o una columna. El proceso de sedimentación se puede acelerar sometiendo la suspensión de los medios de cromatografía a centrifugación o mediante vibración. La solución sobrenadante se puede separar a continuación de los medios de cromatografía transfiriéndolos a través de un pipeteado, jeringa o bomba a un recipiente separado. Adicionalmente, también se puede obtener un sobrenadante filtrando una suspensión de medios de cromatografía a través de una membrana o material poroso.

El término "muestra" se define como la solución que contiene al menos una proteína diana (p. ej., un anticuerpo anti-A o anti-B en este caso) destinada a unirse a un medio de cromatografía, como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la proteína diana es un anticuerpo o una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina es un anticuerpo antigénico del grupo sanguíneo A (es decir, anticuerpo anti-A). En otras realizaciones, la inmunoglobulina es un anticuerpo antigénico del grupo sanguíneo B (es decir, anticuerpo anti-B). Los ejemplos de muestras incluyen, pero no se limitan a, sangre, plasma, derivados del plasma, hemoderivados, alimentación de inmunoglobulinas intravenosas (IGIV).

Los términos "IgG", "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (utilizados indistintamente en la presente memoria) se refieren a una proteína que tiene una estructura de cadena básica de cuatro polipéptidos que consta de dos cadenas pesadas y dos ligeras, estando dichas cadenas estabilizadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro intercatenarios, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Los términos "inmunoglobulina de cadena sencilla" o "anticuerpo de cadena sencilla" (utilizado indistintamente en la presente memoria) se refieren a una proteína que tiene una estructura de cadena de dos polipéptidos que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, estando dichas cadenas estabilizadas, p. ej., por conectores peptídicos intercatenarios, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "dominio" se refiere a una región globular de un polipéptido de cadena pesada o ligera que comprende bucles peptídicos (p. ej., que comprenden de 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, mediante una lámina beta plegada y/o un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios se denominan en la presente memoria adicionalmente "constante" o "variable", en función de la falta relativa de variación de secuencia dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "constante", o la variación significativa dentro de los dominios de varios miembros de la clase en el caso de un dominio "variable". Los "dominios" de anticuerpos o polipéptidos a menudo se denominan indistintamente en la técnica "regiones" de

anticuerpos o polipéptidos. Los dominios "constantes" de las cadenas ligeras de anticuerpos se denominan indistintamente "regiones constantes de cadena ligera", "dominios constantes de cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de las cadenas pesadas de anticuerpos se denominan indistintamente "regiones constantes de cadena pesada", "dominios constantes de cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH".
 5 Los dominios "variables" de las cadenas ligeras de anticuerpos se denominan indistintamente "regiones variables de la cadena ligera", "dominios variables de la cadena ligera", regiones "VL" o dominios "VL". Los dominios "variables" de las cadenas pesadas de anticuerpos se denominan indistintamente "regiones variables de cadena pesada", "dominios variables de cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

10 Las inmunoglobulinas o anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales y pueden existir en forma monomérica o polimérica.

15 El término "cromatografía", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una técnica de separación dinámica que separa o elimina una molécula (p. ej., anticuerpos anti-A y/o anti-B en este caso) de otras moléculas en una muestra. Típicamente, en un método de cromatografía, una fase móvil (líquido o gas) transporta una muestra que contiene la molécula que se debe separar o eliminar a través de un medio de fase estacionaria (normalmente sólido) (p. ej., un medio de cromatografía). Las diferencias en el reparto o la afinidad con respecto a la fase estacionaria separan la molécula de otros componentes de la muestra.

20 El término "cromatografía de afinidad", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un modo de cromatografía en el que una molécula que se debe separar o eliminar (p. ej., anticuerpos anti-A y/o anti-B) se aísla por su interacción con otra molécula (p. ej., un ligando antigénico del grupo sanguíneo A o un ligando antigénico del grupo sanguíneo B inmovilizados sobre un soporte sólido) que interactúa específicamente con la molécula que se debe separar o eliminar. Un medio utilizado en cromatografía de afinidad se denomina medio de cromatografía de afinidad.

25 El término "medio" o "medio de cromatografía", como se emplea indistintamente en la presente memoria, se refiere a un soporte sólido que tiene un ligando antigénico del grupo sanguíneo A y/o un ligando antigénico del grupo sanguíneo B inmovilizado sobre el mismo.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para evaluar la calidad de cualquier medio de cromatografía que sea adecuado para eliminar anticuerpos anti-A y/o anti-B, incluidos los descritos en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. 62/215.401, presentada el 8 de septiembre de 2015.

30 En las realizaciones descritas en la presente memoria, se utiliza una solución de Lectina purificada para evaluar la capacidad de unión de un medio de cromatografía que incluye un ligando antigénico del grupo sanguíneo A o un ligando antigénico del grupo sanguíneo B anclados a un soporte sólido. En otras palabras, las moléculas de Lectina purificadas específicas se utilizan como moléculas modelo para investigar la calidad de un medio de cromatografía adecuado para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B.

35 Los términos "anti-A" o "anticuerpos anti-A" se refieren a los anticuerpos que se unen a los antígenos del grupo sanguíneo A que se encuentran en la superficie de las células en individuos que tienen un grupo sanguíneo tipo A o grupo sanguíneo tipo AB. Por consiguiente, es deseable eliminar tales anticuerpos en muestras derivadas de sangre (p. ej., sangre, hemoderivados, plasma, derivados plasmáticos o una alimentación de IGIV).

40 Los términos "anti-B" o "anticuerpos anti-B" se refieren a los anticuerpos que se unen a los antígenos del grupo sanguíneo B que se encuentran en la superficie de las células en individuos que tienen un grupo sanguíneo tipo B o grupo sanguíneo tipo AB. Por consiguiente, es deseable eliminar tales anticuerpos en muestras derivadas de sangre (p. ej., sangre, hemoderivados, plasma, derivados plasmáticos o una alimentación de IGIV).

45 El término "calidad de un medio", como se emplea en la presente memoria, se refiere a la capacidad de un medio de cromatografía para eliminar selectivamente una entidad no deseable (p. ej., anticuerpos anti-A o anti-B) de una muestra (p. ej., sangre, productos sanguíneos, plasma, derivados del plasma o una alimentación de IGIV). Los métodos proporcionados en la presente memoria son especialmente útiles para evaluar y/o controlar la calidad relativa de diferentes medios (p. ej., diferentes lotes del mismo tipo de medio o el mismo tipo de medio de diferentes fuentes o muestras de medios o prototipos obtenidos durante su desarrollo o procedimiento de fabricación) midiendo su capacidad de unión para una molécula de Lectina purificada específica. En otras palabras, las capacidades de unión relativa de diferentes lotes del mismo tipo de medios o medios obtenidos de diferentes fuentes para una Lectina purificada (es decir, Lectina HP en el caso de un medio que contiene ligando antigénico del grupo sanguíneo A y Lectina GSI-B4 en el caso de un medio que contiene ligando antigénico del grupo sanguíneo B) son indicativas de la capacidad de los medios para eliminar selectivamente los anticuerpos anti-A o anti-B (es decir, la calidad relativa de los medios o las muestras de medios). Por consiguiente, la capacidad de unión de un medio para una molécula de Lectina purificada concreta se puede utilizar para discernir la calidad general del medio con respecto a
 50 otros lotes del mismo medio o la calidad del mismo medio a lo largo del tiempo, p. ej., durante la fabricación, uso,
 55 limpieza y desinfección.

Por lo tanto, un lote de medios diseñados para eliminar los anticuerpos anti-A que tiene una capacidad de unión menor para una Lectina HP purificada que un lote fabricado previamente de ese mismo tipo de medio sería de una

calidad inferior en comparación con el lote anterior, ya que se esperaba que eliminara un porcentaje menor de anticuerpos anti-A de una muestra. Por el contrario, un lote de medios diseñados para eliminar los anticuerpos anti-A que tiene una capacidad de unión mayor para una Lectina HP purificada que un lote fabricado previamente de ese mismo tipo de medios sería de una mejor calidad en comparación con el lote anterior, ya que se esperaba que eliminara un mayor porcentaje de anticuerpos anti-A de una muestra. De manera similar, un lote de medios con menor capacidad de unión para una Lectina GSI-B4 purificada que un lote fabricado previamente de ese mismo tipo de medio sería de una calidad inferior en comparación con el lote anterior, ya que se esperaba que eliminara un porcentaje menor de anticuerpos anti-B de una muestra. Por el contrario, un medio que tenga mayor capacidad de unión para una Lectina GSI-B4 purificada que un lote previamente fabricado de ese mismo tipo de medio sería de mejor calidad que el anterior, ya que se esperaba que eliminara un mayor porcentaje de anticuerpos anti-B de una muestra.

En general, existe la necesidad de controlar la calidad de los medios de cromatografía durante su vida útil para garantizar que los medios conserven su capacidad para eliminar un porcentaje deseable de anticuerpos anti-A o anticuerpos anti-B de una muestra. Por ejemplo, la calidad de los medios de cromatografía puede verse afectada negativamente después del uso repetido, p. ej., después de la exposición a condiciones de limpieza y/o desinfección rigurosas, reduciendo su capacidad para eliminar un porcentaje deseable de anticuerpos anti-A o anticuerpos anti-B de una muestra. La calidad de un lote de medios diseñados para eliminar los anticuerpos anti-A o anti-B se puede controlar midiendo su capacidad de unión para una Lectina purificada, HP y GSI-B4, respectivamente, antes y después de que el medio se haya utilizado o expuesto repetidamente a condiciones de limpieza y/o desinfección rigurosas. Si la capacidad de unión de los medios para una Lectina purificada se ha reducido con respecto al tiempo anterior en que se midió, esto indicaría que los medios ahora eliminarían un porcentaje menor de anticuerpos anti-A o anti-B.

Por consiguiente, los métodos descritos en la presente memoria son útiles para evaluar la calidad de un medio de cromatografía para la eliminación de anti-A o anti-B, a lo largo del tiempo, así como para comparar la calidad de dos lotes de medios separados.

Adicionalmente, los métodos descritos en la presente memoria también se pueden utilizar para la optimización de un medio durante su fabricación o desarrollo. En otras palabras, se puede evaluar un medio prototipo por su capacidad para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B, según sea el caso, simplemente determinando su capacidad de unión para una Lectina purificada, y el medio se pueden mejorar u optimizarse adicionalmente, si fuera necesario, basándose en su capacidad de unión para una Lectina purificada. Por ejemplo, una vez que se fabrica un medio prototipo, se puede evaluar la calidad de ese medio utilizando los métodos descritos en la presente memoria, para determinar si necesita una optimización o modificaciones adicionales. De esta manera, se pueden evaluar fácilmente varias iteraciones del medio durante su desarrollo, lo que conduce a la versión final del medio.

Además, los métodos descritos en la presente memoria también son útiles para diferenciar entre los medios con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A y los medios con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B. Es fácil para un operario o para un usuario final confundir la identidad de los dos medios durante la fabricación y también cuando se utilizan, ya que los dos tipos de medios a menudo se fabrican y también se almacenan en la misma ubicación y aparecen prácticamente idénticos en la inspección visual. Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan una manera de distinguir entre estos dos tipos de medios, es decir, cuando se desconoce si los medios se unen a anticuerpos anti-A o anticuerpos anti-B. Por ejemplo, la capacidad de unión de un medio de identidad desconocida (es decir, si contiene ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A o ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B) se puede evaluar para una Lectina HP purificada y por separado para Lectina GSI-B4 purificada. Un medio desconocido que tenga ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A tendrá una capacidad de unión significativa para la Lectina monoclonal de HP purificada y tendrá una capacidad de unión relativamente baja o insignificante para la Lectina GSI-B4 purificada. Un medio desconocido que tenga antígenos del grupo sanguíneo B tendrá una capacidad de unión significativa para la Lectina GSI-B4 purificada y tendrá una capacidad de unión relativamente baja o insignificante para la Lectina HP purificada.

En algunas realizaciones, la capacidad de unión de un medio desconocido para Lectina HP o GSI-B4 se puede comparar con la capacidad de unión de un medio conocido del mismo tipo para las Lectinas (p. ej., de un lote diferente) para determinar si incluye ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A o los ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B.

II. Medios con antígeno del grupo sanguíneo ilustrativos

Los métodos descritos en la presente memoria son útiles para evaluar la calidad de los medios que se unen a anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo A o anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo B.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para evaluar cualquier medio disponible comercialmente o medios en desarrollo, que se sabe que se unen a los anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo A o los anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo B. Adicionalmente, los métodos descritos en la presente memoria también se pueden utilizar para diferenciar entre los tipos de medios, en caso de que no se sepa si el medio se une al anticuerpo antigénico del grupo sanguíneo A o al anticuerpo antigénico del grupo sanguíneo B.

Los ejemplos de medios que actualmente pueden estar disponibles comercialmente o que han estado disponibles comercialmente al mismo tiempo incluyen, p. ej., la columna A y la columna B Glycosorn ABO ofrecidos por Glycorex Transplantation AB (Sölvegatan 41, 223 70 Lund, Suecia); Sepharose-4B - AFF201 con trisacárido del grupo sanguíneo A, Sepharose-FF - AFF101 con trisacárido del grupo sanguíneo A, Sepharose-4B - AFF202 trisacárido grupo sanguíneo B, y Sepharose-FF - AFF102 con trisacárido del grupo sanguíneo B, ofrecidos por Dextra Laboratories LTD (Science and Technology Centre, Earley Gate, Whiteknights Road, Reading, RG6 6BZ, Reino Unido); los medios Synsoorb A y B, ofrecidos por Chembiomed Ltd (Edmonton, Alberta, Canadá); y los medios Allotran A y B ofrecidos por Lectinity Holding, Inc. (Moscú, Rusia).

En general, cualquier medio se puede evaluar utilizando los métodos descritos en la presente memoria, que incluyen un ligando (típicamente un ligando basado en oligosacáridos) correspondiente a un epítipo del antígeno del grupo sanguíneo tipo A o antígeno del grupo sanguíneo tipo B anclado directamente o indirectamente (mediante un conector o un espaciador) a un soporte sólido. Los medios ilustrativos también se pueden encontrar en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núm. 62/215,401, presentada el 8 de septiembre de 2015.

Los ligandos basados en oligosacáridos ilustrativos se muestran a continuación. Las abreviaturas utilizadas en la estructura se definen de la siguiente manera: Gal = D-galactosa, Fuc = L-fucosa, GalNAc = N-acetil-D-galactosamina, GlcNAc = N-acetil-D-glucosamina, R = la conexión del ligando al soporte sólido, aunque también se pueden utilizar conexiones en otras posiciones sobre la estructura del ligando.

Los ejemplos de ligandos antigénicos del grupo sanguíneo tipo A incluyen, pero no se limitan a, moléculas que tienen las siguientes estructuras: antígeno A trisacárido (GalNAc α 1,3[Fuca1,2]Gal β -R), antígeno A tetrasacárido Tipo 1 (GalNAc α 1,3[Fuca1,2]Gal β 1,3GlcNAc β 1-R), antígeno A tetrasacárido Tipo 2 (GalNAc α 1,3[Fuca1,2]Gal β 1,4GlcNAc β 1-R), antígeno A tetrasacárido Tipo 3 (GalNAc α 1,3[Fuca1,2]Gal β 1,3GalNAc α 1-R), y antígeno A tetrasacárido Tipo 4 (GalNAc α 1,3[Fuca1,2]Gal β 1,3GalNAc β 1-R).

Los ejemplos de ligandos antigénicos de grupo sanguíneo tipo B incluyen moléculas que tienen las siguientes estructuras: antígeno B trisacárido (Gal α 1,3[Fuca1,2]Gal β -R), antígeno B tetrasacárido Tipo 1 (Gal α 1,3[Fuca1,2]Gal β 1,3GlcNAc β 1-R), antígeno B tetrasacárido Tipo 2 (Gal α 1,3[Fuca1,2]Gal β 1,4GlcNAc β 1-R), antígeno B tetrasacárido Tipo 3 (Gal α 1,3[Fuca1,2]Gal β 1,3GalNAc α 1-R), y antígeno B tetrasacárido Tipo 4 (Gal α 1,3[Fuca1,2]Gal β 1,3GalNAc β 1-R).

Uno o más de los ligandos mencionados anteriormente se pueden anclar a un soporte sólido adecuado, dando como resultado de ese modo un medio de cromatografía que es adecuado para eliminar los anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo A y/o del grupo sanguíneo B.

Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, alúmina, sílice, celita, cerámica, óxidos metálicos, vidrio poroso, vidrio de poro controlado, polímeros carbohidratados, polisacáridos, agarosa, sefarsosa, sefadex, dextrano, celulosa, almidón, quitina, zeolitas, polímeros sintéticos, polivinil éter, polietileno, polipropileno, poliestireno, nailon, poliácridatos, polimetacrilatos, poliácridamidas, poli(anhídrido maleico), membranas, fibras huecas y fibras. En algunas realizaciones, el soporte sólido es un soporte sólido polimérico y comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliviniléter, poli(alcohol vinílico), polimetacrilato, poliácridato, poliestireno, poliácridamida, polimetacrilamida y policarbonato. En una realización concreta, el soporte sólido es un soporte sólido con una base de poliviniléter. En algunas realizaciones, el soporte sólido está en forma de esfera (p. ej., una esfera basada en polivinil éter).

Es posible emplear una gran cantidad de grupos funcionales para facilitar el anclaje de un ligando a un soporte sólido. Los ejemplos no limitantes de tales grupos funcionales incluyen amina, tiol, furano, maleimida, epoxi, aldehído, alqueno, alquino, azida, azlactona, carboxilo, ésteres activados, triazina y cloruro de sulfonilo. En una realización concreta, se utiliza un grupo amina como un grupo funcional.

El soporte sólido también se puede modificar y/o activar para incluir uno o más grupos funcionales mencionados anteriormente que facilitan la inmovilización de un ligando o ligandos adecuados al soporte. En una realización concreta, se utilizan grupos carboxilo y aldehído como grupos funcionales.

III. Ensayos para medir la capacidad de unión.

Los métodos descritos en la presente memoria son útiles para evaluar la calidad relativa de los medios (p. ej., durante o después de un procedimiento de fabricación o después de su uso) que se unen o se espera que se unan a los anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo A o los anticuerpos antigénicos del grupo B en una muestra, p. ej., sangre, un producto hematológico, plasma, derivados del plasma o una alimentación de IGIV. Los métodos descritos en la presente memoria se basan, al menos en parte, en la medición de la capacidad de unión de los medios para una molécula de Lectina purificada para evaluar la calidad relativa de los medios, ya sea a lo largo del tiempo o al comparar dos lotes diferentes de un medio o medios de diferentes fuentes. Por consiguiente, los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para diferenciar entre los diferentes lotes del mismo tipo de medios o el mismo lote de medios durante su vida útil de uso o incluso medios de diferentes fuentes. En general, la capacidad de unión de un medio para una molécula particular (p. ej., Lectina) se puede medir de la siguiente manera. Una solución que contiene la molécula se pone en contacto con un medio adecuado en condiciones apropiadas y durante un

período de tiempo adecuado para facilitar la unión de la molécula al medio. Después de eso, la molécula que está unida al medio se separa de la solución de muestra restante y se mide la concentración de la molécula en la solución de muestra restante (es decir, la concentración de molécula no unida). La concentración de la molécula en solución se puede determinar por varios métodos diferentes conocidos en la técnica. Por ejemplo, la absorbancia de la solución se puede medir a una longitud de onda concreta y la concentración de la molécula se puede calcular combinada con el coeficiente de extinción de la molécula (p. ej., una proteína) a esa longitud de onda. Se pueden medir la fluorescencia, la absorbancia UV o Raman para determinar la concentración de proteína. Además, la concentración de una molécula en solución también se puede determinar mediante cromatografía analítica. En ese caso, la intensidad de la detección se correlaciona con la concentración de la molécula.

En las realizaciones descritas en la presente memoria, se mide la capacidad de unión de un medio con ligando del grupo sanguíneo tipo A o un medio con ligando de grupo sanguíneo tipo B para una Lectina HP o una Lectina GSI-B4 purificadas, respectivamente, que es indicativa de cómo ese medio puede realizar la eliminación real de anticuerpos anti-A o anti-B, según sea el caso.

Las realizaciones se ilustran adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

15 Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de medio de cromatografía que contiene ligando trisacárido antigénico del grupo sanguíneo A

Este es un método ilustrativo que se puede utilizar para fabricar un medio con ligando antigénico del grupo sanguíneo A. El medio de cromatografía que contenía el ligando trisacárido antigénico del grupo sanguíneo A (TriA) se sintetizó inmovilizando los ligandos TriA sobre esferas basadas en polivinil éter patentadas (es decir, el soporte sólido utilizado en la presente memoria). La estructura específica del ligando TriA se representa en la Figura 1. El ligando TriA, en este caso, también incluye un conector con un grupo amina, que se utiliza para la inmovilización sobre las esferas de base. Las esferas se activan para incluir un grupo reactivo tal como, p. ej., un grupo epoxi, carboxilo o aldehído, que sea capaz de reaccionar con un grupo amina en el ligando. El ligando TriA se inmoviliza a continuación sobre las esferas mediante una reacción de acoplamiento con el grupo amina primaria (-NH₂).

25 Ejemplo 2. Síntesis de medio de cromatografía que contiene ligando trisacárido antigénico del grupo sanguíneo B

En otro experimento, se preparó un medio con ligando antigénico del grupo sanguíneo B como sigue. El medio de cromatografía que contenía el ligando trisacárido antigénico del grupo sanguíneo B (TriB) se sintetizó inmovilizando los ligandos TriB sobre esferas basadas en polivinil éter patentadas (es decir, el soporte sólido utilizado en la presente memoria). La estructura específica del ligando TriB se representa en la Figura 2. El ligando TriB, en este caso, también incluye un conector con un grupo amina, que se utiliza para la inmovilización sobre las esferas. Como en el caso del ligando TriA anterior, las esferas se activan para incluir un grupo reactivo tal como, p. ej., un grupo epoxi, carboxilo o aldehído, que sea capaz de reaccionar con un grupo amina en el ligando. El ligando TriB se inmoviliza a continuación sobre las esferas de base mediante una reacción de acoplamiento con el grupo amina primaria (-NH₂).

35 Ejemplo 3. Capacidad del medio con ligando trisacárido antigénico del grupo sanguíneo A para Lectina de *Helix pomatia* (HP) como indicador de la calidad del medio.

Este es un ejemplo representativo que demuestra que la capacidad de los medios con ligandos trisacáridos antigénicos del grupo sanguíneo A (TriA) para la Lectina HP purificada (Sigma Aldrich, número de catálogo L3382) se puede utilizar para evaluar la calidad de los medios, p. ej., durante y después de la fabricación. La concentración de un ligando TriA se varió durante la reacción de acoplamiento con el sólido de soporte. Por lo tanto, los medios deben tener una cantidad diferente de los ligandos TriA, que simula el tipo de variación que podría ocurrir durante el proceso de fabricación de los medios. La capacidad de unión estática de los diversos medios con ligando TriA para la Lectina HP se midió posteriormente. Este valor se comparó con el porcentaje de eliminación de anticuerpos IgG anti-A de una alimentación de IGIV.

45 Un conjunto de tubos de microcentrífuga de 2,0 mL se cargó con 0,35 mL de tampón PBS 10 mM o 0,50 mL de tampón PBS 10 mM para los controles. Posteriormente, se añadieron 0,15 mL de una suspensión al 10% de los medios (15 μ L de volumen de medios) en un tampón PBS 10 mM a los tubos de microcentrífuga, a excepción de los controles, seguido de la adición de 0,6 mL de una solución de Lectina HP de 1 mg/ml en tampón PBS. Se añadieron 0,4 mL adicionales de PBS a todos los tubos. Los tubos se dejaron girando durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los tubos de microcentrífuga se sometieron a centrifugación y el sobrenadante resultante se transfirió a dispositivos de filtración centrífuga con una membrana de 0,22 micras. Los dispositivos se sometieron a centrifugación y a continuación se midió la absorbancia del producto filtrado a 280 nm. La absorbancia de la solución de cada muestra se utilizó a continuación para calcular la capacidad de unión estática del medio para la Lectina HP. La capacidad de unión estática para la Lectina HP se comparó con el porcentaje de eliminación de anticuerpos IgG anti-A de una alimentación de IGIV en condiciones de unión estática.

Para medir la eliminación de IgG, se determinó el nivel del anticuerpo policlonal IgG para el antígeno del grupo sanguíneo A (anti-A) en una alimentación de IGIV representativa mediante un método de citometría de flujo

establecido (Christensson, M. et al, Transfusion, 1996, 36, 500-505). Se incubaron glóbulos rojos tipo A con la alimentación de IGIV representativa durante un tiempo predeterminado, seguido de lavados exhaustivos. Las células se tiñeron a continuación con anti-IgG humana marcada con fluorescencia (Alexa Fluor® 488 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgG (H + L), número de componente: 109-546-088, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EE.UU.) y se sometieron a citometría de flujo (Guava 5HT, EMD Millipore). Se utilizaron los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) neta para comparar las concentraciones de IgG policlonal anti-A en la alimentación antes y después del contacto con el medio con ligando antigénico trisacárido del grupo sanguíneo A que se sintetiza en el Ejemplo 1.

Con el fin de simular la variación en la capacidad de los medios observados típicamente durante la fabricación y también entre lotes, las muestras se sintetizaron variando la carga del ligando trisacárido en la etapa de síntesis. La carga de ligandos para las muestras enumeradas en la Tabla 2 estaba en el orden de: Medio Núm. 1 < Medio Núm. 2 < Medio Núm. 3. Se utilizó soporte sólido solo como control, que en este caso eran esferas con una base de poliéter. Como se resume en la Tabla 2 a continuación, este experimento demuestra que la capacidad de unión estática de los diversos medios con ligando TriA para la Lectina HP se correlaciona con el porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A de una alimentación de IGIV en condiciones de unión estática. Se encontró que los medios con ligando TriA con mayores capacidades para Lectina HP eliminaron más anticuerpos IgG anti-A de una alimentación de IGIV. También se encontró que el medio con ligando TriA con menores capacidades de unión estática para la Lectina HP eliminó menos anticuerpos IgG anti-A de una alimentación de IGIV.

Fue algo inesperado encontrar que la capacidad de unión estática de los medios con ligando TriA para la Lectina HP se correlacionara con el porcentaje de eliminación de anticuerpos IgG anti-A, ya que las dos moléculas, p. ej., la IgG y la Lectina HP son tipos de moléculas muy diferentes.

Tabla 2. Capacidad de unión de tres medios TriA diferentes y control para la Lectina HP y porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A.

	Capacidad de unión estática de la Lectina HP (mg/ml)	Porcentaje de eliminación de IgG anti-A de una alimentación de IGIV
Medio TriA Núm. 1	4,0	81%
Medio TriA Núm. 2	5,7	82%
Medio TriA Núm. 3	7,6	84%
Control	<0,01	Ninguno

Ejemplo 4. Capacidad de unión de los medios con ligando trisacárido antigénico del grupo sanguíneo B para Lectina IsoLectina B4 de *Griffonia Simplicifolia* (GSI-B4) como indicador de la calidad de los medios.

Este es un ejemplo representativo que demuestra que la capacidad de los medios con ligandos trisacáridos antigénicos del grupo sanguíneo B (TriB) para la Lectina GSI-B4 (Sigma Aldrich; Núm. de Cat. L3019) se puede utilizar para evaluar la calidad de los medios, p. ej., durante y después de la fabricación. La concentración de los ligandos TriB se varió durante la reacción de acoplamiento con el soporte sólido para simular la variación observada durante la fabricación. La capacidad de unión estática de los diversos medios con ligando TriB para Lectina GSI-B4 se midió y comparó con el porcentaje de eliminación de anticuerpos IgG anti-B de una alimentación de IGIV. Si se encuentra que los dos valores se correlacionan, se puede utilizar la medición de la capacidad del medio con ligando TriB para la Lectina GSI-B4 para evaluar su capacidad para eliminar los anticuerpos IgG anti-B de una alimentación de IGIV. Las especificaciones del producto para la calidad de los medios con TriB se pueden establecer posteriormente en función de su capacidad para la Lectina GSI-B4.

Un conjunto de tubos de microcentrífuga de 2,0 mL se cargó con 0,35 mL de tampón PBS o 0,50 mL de tampón PBS para los controles. Posteriormente, se añadieron a los tubos de microcentrífuga 0,15 mL de una suspensión al 10% del medio (15 µL de volumen de medios) en tampón PBS 10 mM, excepto para los controles, seguido de la adición de 0,6 mL de una solución de Lectina GSI-B4 de 1 mg/ml en tampón PBS. Se añadieron 0,4 mL adicionales de PBS a todos los tubos. Los tubos se dejaron girando durante 16 horas a temperatura ambiente. A continuación, los tubos de microcentrífuga se colocaron en una centrífuga y a continuación el sobrenadante se transfirió a un dispositivo de filtración centrífuga con una membrana de 0,22 micras. Los dispositivos se sometieron a centrifugación y a continuación se midió la absorbancia del producto filtrado a 280 nm. La absorbancia de la solución de cada muestra se utilizó a continuación para calcular la capacidad de unión estática del medio para la Lectina GSI-B4. La capacidad de unión estática para la Lectina GSI-B4 se comparó a continuación con el porcentaje de eliminación obtenido cuando se utilizó el mismo medio para eliminar los anticuerpos IgG anti-B de una alimentación de IGIV en condiciones de unión estática.

5 Para medir la eliminación de IgG, se determinó el nivel del anticuerpo policlonal IgG para el antígeno del grupo sanguíneo B (anti-B) en una alimentación IGIV representativa mediante un método de citometría de flujo establecido (Christensson, M. et al, Transfusion, 1996, 36, 500-505). Los glóbulos rojos de tipo B se incubaron con la alimentación de IGIV representativa durante un tiempo predeterminado, seguido de lavados exhaustivos. Las células se tiñeron a continuación con anti-IgG humana marcada con fluorescencia como anteriormente, y se sometieron a citometría de flujo (Guava 5HT, EMD Millipore). Se utilizaron los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) neta para comparar las concentraciones de IgG policlonal anti-B en la alimentación antes y después del contacto con el medio con ligando antigénico trisacárido del grupo sanguíneo B que se sintetiza en el Ejemplo 2.

10 Para simular la variación en la capacidad de los medios para eliminar los anticuerpos IgG anti-B, se sintetizaron muestras variando la carga del ligando trisacárido en la etapa de síntesis. La carga de ligando para las muestras enumeradas en la Tabla 3 fue del orden de: Medio Núm. 4 < Medio Núm. 5 < Medio Núm. 6. Se utilizó soporte sólido solo como control, que en este caso eran esferas con una base de poliéter. Como se resume en la Tabla 3 a continuación, este experimento demuestra que la capacidad de unión estática de los diversos medios con ligando TriB para Lectina GSI-B4 se correlaciona con el porcentaje de eliminación de anticuerpos IgG anti-B de una alimentación de IGIV en condiciones de unión estática. Se encontró que los medios con ligando TriB con mayores capacidades para Lectina GSI-B4 eliminaron más anticuerpos IgG anti-B de una alimentación de IGIV. También se encontró que el medio con ligando TriB con menores capacidades de unión estática para la Lectina GSI-B4 eliminó menos anticuerpos IgG anti-B de una alimentación de IGIV.

20 Fue algo inesperado encontrar que la capacidad de unión estática de los medios con ligando TriB para Lectina GSI-B4 se correlaciona con el porcentaje de eliminación de anticuerpos IgG anti-B, ya que las dos moléculas, p. ej., IgG y Lectina GSI-B4 son tipos muy diferentes de moléculas.

Tabla 3. Capacidad de unión de tres medios TriB diferentes y control para GSI-B4 y porcentaje de eliminación de IgG anti-B de una alimentación de IGIV.

	Capacidad de unión estática GSI-B4 (mg/ml)	Porcentaje de eliminación de IgG anti-B eliminada de una alimentación de IGIV
Medio TriB Núm. 4	0,19	74%
Medio TriB Núm. 5	0,33	86%
Medio TriB Núm. 6	0,58	92%
Control	<0,01	Ninguno

25 Ejemplo 5. Un método para distinguir entre medios con ligandos trisacáridos antigénicos del grupo sanguíneo A y medios con ligandos trisacáridos antigénicos del grupo sanguíneo B midiendo las capacidades relativas de los medios para Lectinas HP y GSI-B4

30 Este es un ejemplo representativo que demuestra que las capacidades relativas de los medios con ligandos trisacáridos antigénicos del grupo sanguíneo A (TriA) y los medios con ligandos trisacáridos antigénicos del grupo sanguíneo B (TriB) para las Lectinas HP y GSI-B4 se pueden utilizar para diferenciar entre los tipos de medios. .

35 Un conjunto de tubos de microcentrifuga de 2,0 mL se cargó con 0,35 mL de tampón PBS o 0,50 mL de tampón PBS para los controles. Posteriormente, se añadieron 0,15 mL de una suspensión al 10% de los medios (15 µL de volumen de medios) en tampón PBS a los tubos de microcentrifuga, excepto para las soluciones de control. Se añadieron a todos los tubos 0,6 mL de una solución de Lectina HP de 1,0 mg/ml en tampón PBS y 0,6 mL de una solución de Lectina GSI-B4 de 1,0 mg/ml en tampón PBS. Se añadieron 0,4 mL adicionales de tampón PBS a los tubos de centrifuga. Se dejó que los tubos giraran durante 4 horas y 16 horas a temperatura ambiente para las Lectinas HP y GSI-B4, respectivamente. Los tubos de microcentrifuga se colocaron en una centrífuga y el sobrenadante resultante se transfirió a un dispositivo de filtración centrífuga con una membrana de 0,22 micras. Los dispositivos se sometieron a centrifugación y la absorbancia del producto filtrado se midió a 280 nm. La absorbancia de la solución de cada muestra se utilizó a continuación para calcular la capacidad de unión estática del medio para la Lectina HP y GSI-B4.

45 Como se resume en la Tabla 4 a continuación, este experimento demuestra que las capacidades de unión relativa de los medios para las Lectinas HP y GSI-B4 se pueden utilizar para diferenciar entre los tipos de medios. Específicamente, se encontró que los medios con ligando TriA tenían una capacidad de unión significativa para la Lectina HP, mientras que tenían una capacidad de unión casi insignificante para la Lectina GSI-B4. Por el contrario, los medios con ligando TriB tenían una capacidad de unión significativa para la Lectina GSI-B4, mientras que tenían una capacidad de unión casi insignificante para la Lectina HP. Por lo tanto, en casos en los que la identidad de una

muestra de medios es desconocida y no se sabe si es adecuada para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B, se puede medir la capacidad de unión de las muestras de medios para Lectinas HP y GSI-B4, como se describe en la presente memoria, para determinar de ese modo si es adecuada para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B.

Tabla 4. Capacidad de los medios con ligando TriA y medios con ligando TriB para Lectinas HP y GSI-B4.

	Capacidad de unión a Lectina HP (mg/ml)	Capacidad de unión estática a Lectina GSI-B4 (mg/ml)
Medio TriA Núm. A	7,60	<0,1
Medio TriA Núm. B	<0,1	0,58

5

Ejemplo 6. Capacidad de los medios con ligandos trisacáridos antigénicos del grupo sanguíneo A y B para Lectina de *Griffonia Simplicifolia* (GS-I) como indicador de la calidad de los medios.

Este es un ejemplo representativo que demuestra que la capacidad de los medios con ligandos trisacáridos antigénicos de los grupos sanguíneos A y B (TriA y TriB) para Lectina GS-I (Sigma Aldrich; L2380) se puede utilizar para evaluar la calidad de los medios, p. ej., durante y después de la fabricación. Se mide la capacidad de unión estática de los diversos medios con ligando TriA y TriB para GS-I. Este valor se compara a continuación con el porcentaje de eliminación de anticuerpos IgG anti-A y anti-B de una alimentación de IGIV. Si se encuentra que los dos valores se correlacionan, la medición de la capacidad de los medios con ligando TriA y TriB para la Lectina GS-I se puede utilizar para evaluar su capacidad para eliminar los anticuerpos IgG anti-A y anti-B de una alimentación de IGIV. Las especificaciones del producto para la calidad de los medios TriA y TriB se pueden establecer posteriormente en función de su capacidad de unión para Lectina GS-I.

Un conjunto de tubos de microcentrifuga de 2,0 mL se cargó con 0,35 mL de tampón PBS o 0,50 mL de tampón PBS para los controles. Posteriormente, se añadieron 0,15 mL de una suspensión al 10% de los medios (15 µL de volumen de medios) en tampón PBS a los tubos de microcentrifuga, excepto para las soluciones de control. Se añadieron 0,6 mL de una solución de Lectina GS-I de 1,0 mg/mL en tampón PBS a todos los tubos y se añadieron 0,4 mL adicionales de PBS a todos los tubos. Se dejó que los tubos giraran durante 16 horas a temperatura ambiente. A continuación, los tubos de microcentrifuga se colocaron en una centrífuga y a continuación el sobrenadante resultante se transfirió a dispositivos de filtración centrífuga con una membrana de 0,22 micras. Los dispositivos se sometieron a centrifugación y la absorbancia del filtrado se midió a 280 nm. La absorbancia de la solución de cada muestra se utilizó a continuación para calcular la capacidad de unión estática del medio para la Lectina GS-I. La capacidad de unión estática para la Lectina GS-I se comparó a continuación con el porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B de una alimentación de IGIV en condiciones de unión estática.

Como se resume en la Tabla 5 a continuación, este experimento demuestra que la capacidad de unión estática de los diversos medios con ligando TriA y TriB para Lectina GS-I se correlaciona con el porcentaje de eliminación de anticuerpos IgG anti-A y anti-B de una alimentación de IGIV en condiciones unión estática. Se encontró que los medios con ligando TriA y TriB con capacidad de unión significativa para la Lectina GS-I también eliminaban cantidades significativas de anticuerpos IgG anti-A y anti-B, respectivamente, de una alimentación de IGIV.

Tabla 5. La capacidad de unión de medios TriB para GS-I se correlaciona con el porcentaje de eliminación de IgG anti-B eliminada de una alimentación de IGIV.

	Capacidad de unión estática de Lectina GS-I (mg/ml)	Porcentaje de eliminación de IgG anti-B eliminada de una alimentación de IGIV
Medio TriA Núm. B1	0,33	81%
Medio TriB Núm. B2	0,81	92%

35

Ejemplo 7. Generación de una mezcla de medios basada en capacidades de unión para Lectinas HP-1 y GSI-B4

Como se observa en la presente memoria, la capacidad de unión de un medio con antígeno del grupo sanguíneo A o un medio con antígeno del grupo sanguíneo B a las Lectinas HP-1 y GSI-B4 purificadas, respectivamente, es un buen indicio para evaluar o predecir cómo pueden funcionar realmente tales medios para la eliminación de anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo A o anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo B de una muestra (p. ej., sangre, hemoderivados, plasma o una alimentación con IGIV).

40

La medición de la capacidad de unión para una Lectina también se puede utilizar para generar una mezcla de tales

medios en la proporción correcta, que a continuación se puede utilizar para eliminar tanto los anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo A como los anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo B de una muestra en una etapa de cromatografía.

5 Esto es particularmente útil ya que, en general, las cantidades de anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo A y anticuerpos antigénicos del grupo sanguíneo B tienden a variar de una muestra a otra. Por lo tanto, una mezcla de medios que puede funcionar bien para la eliminación de tales anticuerpos de una muestra puede no funcionar tan bien en el caso de otra muestra.

10 Los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para diseñar una mezcla de medios que funcionaría bien para una muestra, simplemente sabiendo las cantidades de anticuerpos anti-A y anti-B en esa muestra.

15 Por ejemplo, dado que la capacidad de unión de un medio para una Lectina HP y GSI-B4 se correlaciona con la eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B, respectivamente, de una muestra, una vez que se conocen el nivel o la cantidad de anticuerpos anti-A y anti-B en una muestra, se puede diseñar una mezcla de medios, de modo que tenga una proporción de medios con antígeno del grupo sanguíneo A y medios con antígeno del grupo sanguíneo B, que serían adecuados para eliminar una cantidad deseada de anticuerpos anti-A y/o anti-B de la muestra.

20 La memoria descriptiva se entiende mejor a la luz de las enseñanzas de las referencias citadas en la memoria descriptiva. Las realizaciones en la memoria descriptiva proporcionan una ilustración de las realizaciones. A menos que se indique lo contrario, se debe entender que el término "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie.

REIVINDICACIONES

1. Un método para comparar la calidad de dos o más muestras de medios de cromatografía de afinidad que contienen ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A anclados a un soporte sólido, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 (a) para cada una de las muestras de medios, proporcionar una solución de Lectina HP purificada de concentración C1 y volumen VM conocidos y una muestra de medios de cromatografía de afinidad de volumen VR;
- (b) incubar cada muestra de medio de cromatografía con la solución de (a);
- 10 (c) obtener un sobrenadante y medir la concentración C2 de la Lectina HP purificada en el sobrenadante, para cada muestra de medio de cromatografía;
- (d) determinar la capacidad de unión estática de cada muestra de medio de cromatografía para la Lectina purificada, en donde la capacidad de unión estática se mide utilizando la ecuación

$$\frac{[C1-C2] \times VM}{VR}$$

VR

- 15 en donde la capacidad de unión estática de las muestras de medios se correlaciona con su capacidad para eliminar anticuerpos anti-A de una muestra, proporcionando así una comparación de la calidad de dos o más muestras de medios de cromatografía de afinidad diferentes.

2. Un método para comparar la calidad de dos o más muestras de medios de cromatografía de afinidad que contienen ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B anclados a un soporte sólido, comprendiendo el método las etapas de:

- 20 (a) para cada una de las muestras de medios, proporcionar una solución de Lectina GSI-B4 purificada de concentración C1 y volumen VM conocidos y una muestra de medios de cromatografía de afinidad de volumen VR;
- (b) incubar cada muestra de medio de cromatografía con la solución de (a);
- 25 (c) obtener un sobrenadante y medir la concentración C2 de la Lectina GSI-B4 en el sobrenadante, para cada muestra de medio de cromatografía;
- (d) determinar la capacidad de unión estática de cada muestra de medio de cromatografía para la Lectina GSI-B4 purificada, en donde la capacidad de unión estática se mide utilizando la ecuación

$$\frac{[C1-C2] \times VM}{VR}$$

VR

- 30 en donde las capacidades de unión estática de las muestras de medios se correlacionan con su capacidad para eliminar anticuerpos anti-B de una muestra, proporcionando así una comparación de la calidad de dos o más muestras de medios de cromatografía de afinidad.

35 3. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el soporte sólido es un soporte sólido polimérico poroso o no poroso que comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poliviniléter, poli(alcohol vinílico), polimetacrilato, poli(acrilato), poliestireno, poli(acrilamida), polimetacrilamida y policarbonato.

4. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el soporte sólido es un soporte sólido poroso con una base de poliviniléter.

5. El método según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el soporte sólido está en forma de esfera.

40 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las dos o más muestras de medios de cromatografía de afinidad constituyen diferentes lotes de los mismos medios.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde las diferentes muestras de medios de cromatografía de afinidad constituyen los mismos medios en diferentes fases de uso.

45 8. El método según la reivindicación 1 o las reivindicaciones dependientes de la misma, en donde la capacidad de unión de los medios con ligando antigénico del grupo sanguíneo A para Lectina HP purificada se correlaciona con su capacidad para eliminar anticuerpos anti-A de una muestra.

9. El método según la reivindicación 2 o las reivindicaciones dependientes de la misma, en donde la capacidad de

unión de los medios con ligando antigénico del grupo sanguíneo B para la Lectina GSI-B4 purificada se correlaciona con su capacidad para eliminar anticuerpos anti-B de una muestra.

10. El método según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, hemoderivados, plasma, derivados de plasma y alimentación de IGIV.

5 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la medición de la concentración comprende determinar la absorbancia a 280 nm.

12. Un método para evaluar la calidad de un medio después de la exposición a condiciones ácidas o alcalinas, en donde el método comprende las etapas de:

10 (a) proporcionar un medio de cromatografía que tiene ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A o ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B anclados a un soporte sólido;

(b) medir la capacidad de unión de los medios para Lectina HP purificada en el caso del anticuerpo antigénico del grupo sanguíneo A o para la Lectina GSI-B4 purificada en el caso del anticuerpo antigénico del grupo sanguíneo B;

(c) exponer el medio a condiciones ácidas o alcalinas durante al menos 5 horas; y

15 (d) medir la capacidad de unión del medio para Lectina HP purificada en el caso del anticuerpo antigénico del grupo sanguíneo A o para la Lectina GSI-B4 purificada en el caso del anticuerpo antigénico del grupo sanguíneo B;

en donde una reducción en la capacidad de unión de los medios en (d) con respecto a (b) indica que la calidad de los medios ha disminuido después de la exposición al ácido en condiciones alcalinas.

20 13. El método según la reivindicación 12, en donde una disminución en la calidad de los medios comprende una reducción en la capacidad de los medios para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B.

14. Método para determinar si un medio comprende los ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A o los ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B, en donde el método comprende las etapas de:

25 (a) proporcionar un medio, en donde se desconoce si el medio comprende ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A o ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B;

(b) medir la capacidad de unión de los medios desconocidos para Lectina HP purificada y por separado para Lectina GSI-B4 purificada;

30 (c) comparar la capacidad de unión de los medios desconocidos para Lectina HP purificada y para Lectina GSI-B4 purificada, en donde se determina que los medios comprenden ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A, si la capacidad de unión de los medios para Lectina HP es mayor que la capacidad de unión para Lectina GSI-B4, y se determina que los medios comprenden ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B si la capacidad de unión de los medios para Lectina GSI-B4 es mayor que la capacidad de unión para Lectina HP.

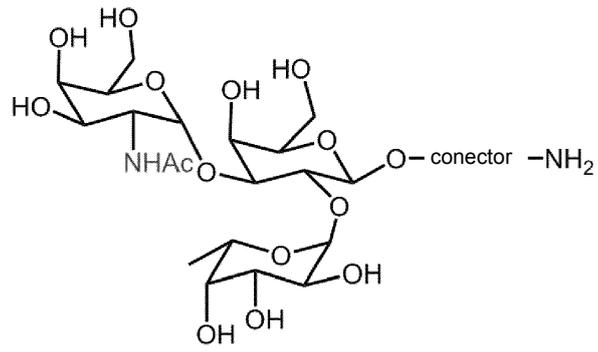


Figura 1

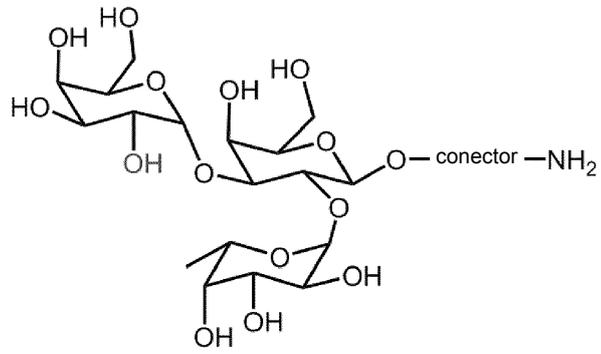


Figura 2