

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 311**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2016** **E 16159748 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 3135687**

54 Título: **Procedimiento de preparación de inmunoglobulinas**

30 Prioridad:

31.08.2015 ES 201531243

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

30.07.2019

73 Titular/es:

**INSTITUTO GRIFOLS, S.A. (100.0%)
Polig. Levante-can Guasch, 2
08150 Parets del Valles (Barcelona), ES**

72 Inventor/es:

**RISTOL DEBART, PERE;
GRANCHA GAMON, SALVADOR;
JORQUERA NIETO, JUAN IGNACIO;
FARO TOMAS, MARIA MERCEDES y
JORBA GRIFOLS, NURIA**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 721 311 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de inmunoglobulinas

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de preparación de inmunoglobulinas. La composición de inmunoglobulinas obtenida es adecuada, por ejemplo, para administración parenteral.

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que pueden encontrarse de forma soluble en la sangre u otros fluidos corporales de los vertebrados, y son empleadas por el sistema inmunitario para identificar y neutralizar elementos extraños tales como bacterias, virus o parásitos. Las inmunoglobulinas tienen diversas aplicaciones médicas tales como diagnóstico de enfermedades, tratamientos terapéuticos y terapia prenatal. Las aplicaciones terapéuticas más comunes de las inmunoglobulinas se pueden clasificar en tres grupos generales de patologías: inmunodeficiencias primarias (déficit de la respuesta humoral), inmunodeficiencias secundarias o adquiridas (como por ejemplo, en el caso de la prevención y tratamiento de infecciones por virus) y las de origen autoinmune (desarrollos de anticuerpos).

La administración de las inmunoglobulinas puede realizarse por diferentes vías tales como por vía intramuscular, vía intravenosa y vía subcutánea, entre otras. De ellas, es preferente utilizar la vía intravenosa, dado que presenta numerosas ventajas, principalmente una mayor eficacia terapéutica.

Habitualmente, las inmunoglobulinas se purifican a partir de plasma humano utilizando procedimientos basados en el método de fraccionamiento de Cohn (Cohn EJ. y otros, J Am Chem Soc, 1946, 62, 459-475), en el método de Cohn-Oncley (Oncley JL. y otros, J Am Chem Soc, 1949, 71, 541-550) u otros equivalentes con etanol en frío, por ejemplo el método de Kistler-Nitschmann (Kistler P, Nitschmann H, 1962, 7, 414-424). Así, a partir de fracciones ricas en inmunoglobulinas (tales como la Fracción II+III, o la Fracción II, o el precipitado A, o el precipitado de gammaglobulina GG) obtenidas por cualquiera de los anteriores métodos, se han introducido modificaciones para purificar más exhaustivamente las inmunoglobulinas (IgG) y hacerlas tolerables para su administración, preferentemente, intravenosa. Dichas modificaciones se han introducido, por ejemplo, para eliminar los agregados y otras impurezas, así como para garantizar la seguridad del producto. Sin embargo, la adición de múltiples etapas al procedimiento de preparación de inmunoglobulinas disminuye el rendimiento de dicho procedimiento y aumenta los costes de fabricación. La demanda creciente de productos de inmunoglobulinas, principalmente para administración por vía intravenosa, ha hecho que el rendimiento sea un aspecto crítico en el proceso de obtención de las mismas a escala industrial.

De los métodos descritos en la técnica anterior, los procedimientos para obtener composiciones de inmunoglobulinas que son tolerables por vía intravenosa cabe destacar los que utilizan etapas de: precipitación con polietilenglicol (PEG), cromatografía de intercambio iónico, métodos físico-químicos con capacidad para la inactivación viral, o tratamiento con enzimas y modificación química parcial de las moléculas de inmunoglobulinas.

Así, es necesario garantizar la seguridad del producto mediante la implementación de etapas robustas con capacidad de eliminar agentes biológicos patogénicos. Habitualmente se utiliza el método del solvente-detergente con capacidad para inactivar virus con envoltura lipídica, dado que no reduce de forma severa la actividad biológica de las proteínas. Sin embargo, dada la toxicidad de las mezclas solvente-detergente, este reactivo utilizado tiene que ser extensivamente eliminado antes de la obtención del producto final, lo cual aumenta el tiempo del proceso y disminuye el rendimiento. Los procedimientos descritos para la eliminación de dicho solvente-detergente no son sencillos y habitualmente requieren la utilización de técnicas de adsorción cromatográfica, ya sea directamente por interacción hidrofóbica, o mediante captura indirecta de la inmunoglobulina en resinas de intercambio iónico y separación del solvente-detergente no retenido. En todos los casos, los procesos son costosos y laboriosos, implicando pérdidas significativas de proteína.

Sin embargo, en el estado de la técnica se conocen tratamientos con capacidad de inactivación viral alternativos, más simples y eficientes. Por ejemplo, se ha utilizado el ácido graso ácido caprílico (también denominado ácido octanoico) o sales del mismo.

En la Patente en Estados Unidos US4446134 se utiliza el caprilato de sodio en combinación con aminoácidos y tratamiento térmico como procedimiento con capacidad de inactivación viral en un procedimiento de preparación de factor VIII. Aunque se cree que el agente viricida capaz de disgregar las membranas lipídicas es el ácido caprílico no disociado, el procedimiento que lo utiliza se llama comúnmente inactivación por caprilato, según la convención bioquímica de denotar una solución de un ácido y su forma ionizada con el nombre de esta última, es decir, caprilato.

El ácido caprílico también se ha utilizado como agente de precipitación para purificar inmunoglobulinas (Steinbuch, M. y otros, Arch. Biochem. Biophys., 1969, 134(2), 279-284). La pureza de las inmunoglobulinas y el rendimiento dependen principalmente de la concentración de ácido caprílico añadido y del pH. Steinbuch, M. y otros también plantean que es ventajoso añadir una cantidad efectiva de caprilato en dos etapas diferentes con la eliminación del precipitado entre ambas etapas. De este modo, el procedimiento presentaría capacidad para la eliminación de virus con envoltura así como sin envoltura, mediante la partición en el precipitado de las proteínas no inmunoglobulinas.

Por otra parte en el estado de la técnica también se ha descrito, la combinación de la precipitación con caprilato seguida de una cromatografía de intercambio iónico para la purificación de inmunoglobulinas (Steinbuch, M. y otros supra).

La Patente Europea EP0893450 da a conocer la purificación de IgG a partir de la fracción II+III (obtenida utilizando procedimientos basados en el método de Cohn mencionado anteriormente), incluyendo dos columnas de intercambio aniónico en serie posteriores a las etapas de adición de caprilato a una concentración entre 15-25 mM en doble etapa de precipitación y combinando ambos efectos del caprilato: la reducción de proteínas no inmunoglobulinas por precipitación y la capacidad de inactivación viral mediante incubación. Las etapas de intercambio aniónico posteriores, además de eliminar otras impurezas (IgM, IgA, albúmina y otras impurezas), se utilizan para la eliminación del caprilato, razón por la cual se requiere una doble adsorción empleando cantidades relativamente importantes de resinas aniónicas.

Además, la solicitud de Patente PCT WO2005/082937 da a conocer asimismo un procedimiento de preparación de una composición que comprende inmunoglobulinas y que comprende las etapas de añadir caprilato y/o heptanoato a la solución o composición que comprende inmunoglobulinas y, posteriormente, aplicar dicha solución en una columna con resina de intercambio aniónico.

La solicitud de Patente PCT WO2005/073252 da a conocer un procedimiento para la preparación de inmunoglobulinas usando caprilato. Sin embargo, la presencia de un poliéter o polímero de glicol en el material de partida no se menciona y se añade en el procedimiento en una inmunoglobulina cruda.

Sin embargo, los presentes inventores han comprobado que la utilización del caprilato a una concentración y pH apropiados (por ejemplo pH 5,0-5,2) para conferir al tratamiento la capacidad de inactivación viral, tal y como se ha descrito en el estado de la técnica anterior, provoca la formación de agregados proteicos de alto peso molecular, que son parcialmente irreversibles por dilución y/o cambio de pH. Además, estos agregados son sólo parcialmente separables por filtración, requiriéndose, por tanto, una etapa específica de separación posterior, por ejemplo, mediante cromatografía o precipitación. La separación de dichos agregados provoca importantes pérdidas de proteína y una disminución del rendimiento del proceso industrial de obtención de inmunoglobulinas.

Asimismo, los presentes inventores han comprobado que la presencia de agregados formados durante el tratamiento con caprilato, incluso a niveles muy reducidos, dificulta la correcta eliminación del caprilato mediante aplicación directa de una etapa de separación por membrana de ultrafiltración en las mejores condiciones de proceso. Dichos agregados dificultan o imposibilitan la preparación de una solución de inmunoglobulinas a concentraciones terapéuticas (por ejemplo, entre 5 % y 20 %) al presentar coloides (turbidez) o inestabilidad en forma líquida, dificultando o impidiendo, por tanto, etapas posteriores del procedimiento de preparación de inmunoglobulinas, tales como la nanofiltración y la filtración esterilizante.

Como consecuencia de lo anterior, los presentes inventores han desarrollado un procedimiento de preparación de soluciones de inmunoglobulinas que, sorprendentemente, incluye un tratamiento con caprilato con capacidad de inactivación viral a una menor concentración de caprilato que la descrita en el estado de la técnica anterior y que, al estar la solución inicial convenientemente purificada y diluida, y en presencia de al menos un poliéter o polímero de glicol inhibe, previene, evita o no promueve la aparición de agregados.

Adicionalmente, los presentes inventores han descubierto que la presencia de al menos un poliéter o polímero de glicol en el procedimiento de la presente invención no interfiere en la actividad y la eficacia del caprilato en relación con su capacidad para inactivar virus con envoltura.

En un aspecto adicional, los presentes inventores describen por primera vez un procedimiento para la obtención de inmunoglobulinas, que además de incluir el tratamiento con capacidad de inactivación en condiciones óptimas, contempla la posibilidad de eliminación o reducción de los reactivos caprilato y poliéter o polímero de glicol (previamente presentes durante dicho tratamiento) empleando únicamente la técnica de ultrafiltración. Dicha etapa de ultrafiltración permite purificar y concentrar el producto a niveles tolerables para su administración, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, sin que se produzcan agregados proteicos de inmunoglobulinas en el producto final. De esta manera, se elimina la necesidad de interponer otras etapas de separación posteriores al tratamiento por caprilato, tales como, por ejemplo, una cromatografía. Además, los niveles remanentes de poliéter o polímero de glicol y caprilato tras la ultrafiltración permiten alcanzar concentraciones de inmunoglobulinas, por ejemplo, IgGs, de hasta el 20 ± 2 %, y que, correctamente formuladas, no se desestabilizan durante su conservación en forma líquida.

Dada la simplificación del procedimiento de la presente invención, éste permite aumentar notablemente el rendimiento y disminuir muy significativamente los costes de producción en relación con los procedimientos previos descritos en el estado de la técnica anterior, sin comprometer por ello el nivel de seguridad o pureza del producto.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una solución de inmunoglobulinas que comprende la adición de ácido caprílico o sales del mismo, en presencia de al menos un

poliéter o polímero de glicol, a la solución de inmunoglobulinas purificada y la posterior eliminación o reducción de dichos reactivos mediante ultrafiltración/diafiltración.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la implementación de una única etapa de ultrafiltración/diafiltración para la eliminación o reducción de los niveles de ácido caprílico o sales del mismo y/o el poliéter o polímero de glicol utilizados para la inactivación viral en procesos de obtención de proteínas.

10 Por lo tanto, la presente invención, da a conocer un procedimiento de preparación de una solución de inmunoglobulinas a partir de una solución inicial de inmunoglobulinas con una pureza mayor o igual a un 96 % en presencia de un poliéter o polímero de glicol, caracterizado porque comprende las etapas de:

- a) añadir ácido caprílico o sales del mismo a la solución inicial;
- b) ajustar el pH de la solución obtenida en la etapa a);
- 15 c) incubar la solución obtenida en la etapa b) durante un tiempo y temperatura necesarios para la inactivación de virus envueltos; y
- d) llevar a cabo una etapa de ultrafiltración/diafiltración a la solución obtenida en la etapa c).

20 El procedimiento de la presente invención puede comprender además una etapa de formulación final de la solución obtenida en la etapa d).

25 En el procedimiento de la presente invención, la solución inicial de inmunoglobulinas tiene su origen en la fracción I+II+III, la fracción II+III, o la fracción II, obtenidas según el método de Cohn, o Cohn-Oncley, o del precipitado A o I+A o GG, obtenidos por el método de Kistler-Nitschmann, o variaciones de los mismos, que han sido purificadas adicionalmente hasta obtener una pureza mayor o igual a un 96 % de IgG. Preferentemente, la solución inicial de inmunoglobulinas tiene su origen en la fracción II+III del método de Cohn o variaciones de la misma, que ha sido purificada posteriormente mediante precipitación con PEG y cromatografía aniónica, tal como se describe en el documento EP1225180B1. Según esta patente, cualquiera de las fracciones anteriores se podría someter a un procedimiento de precipitación mediante la utilización de PEG, seguido de una filtración para eliminar el precipitado y de una purificación adicional a través de una columna de intercambio iónico (por ejemplo, una columna con DEAE Sepharose). En todos estos casos la solución inicial de inmunoglobulinas tiene su origen en el plasma humano.

35 En la realización más preferente, la solución inicial de inmunoglobulinas tiene su origen en la fracción II + III obtenida por procedimientos basados en el método de Cohn, la cual se purifica adicionalmente por cualquiera de los métodos descritos en la técnica anterior, hasta conseguir el grado de purificación adecuado para ser sometido al tratamiento con caprilato en las condiciones no precipitantes de la presente invención, es decir, un valor de pureza mayor o igual a un 96 % (p/v) de IgG determinada por electroforesis en acetato de celulosa, con un contenido de albúmina preferentemente menor o igual al 1 % (p/v) con respecto al total de proteínas. Así, dicha solución inicial de inmunoglobulinas se halla suficientemente purificada, antes y después del tratamiento con caprilato, para la vía de administración terapéutica a la cual vaya destinada, de forma que no se requiera ninguna purificación adicional posteriormente a la etapa con capacidad de inactivación viral de la presente invención.

40 Las inmunoglobulinas de la solución inicial del procedimiento de la presente invención también pueden ser obtenidas por métodos de genética recombinante, por ejemplo, por expresión en cultivos celulares; métodos de síntesis química; o métodos de producción transgénica de la proteína.

45 En la realización más preferente, las inmunoglobulinas mencionadas en el procedimiento de la presente invención son IgGs. Se contempla que dichas IgGs sean monoclonales o policlonales. En la realización más preferente, las IgGs son policlonales.

50 Se contempla que los poliéteres o polímeros de glicol de la presente invención sean poliéteres de alcano u óxidos de polialcano, denominados también poliglicoles, y se refieren, por ejemplo, a los derivados de etilo o etileno y propilo o propileno, más conocidos como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG) o equivalentes de los mismos. Adicionalmente, dichos reactivos han de ser compatibles con las inmunoglobulinas en el sentido que no comprometan la estabilidad o la solubilidad de las mismas y que, por su tamaño, puedan ser favorablemente eliminados por técnicas de ultrafiltración, o, por su menor toxicidad, sean compatibles para el uso terapéutico de las inmunoglobulinas.

55 En una realización preferente, el poliéter o polímero de glicol se selecciona entre polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG) o combinaciones de los mismos. Preferentemente, el poliéter o polímero de glicol es PEG, más preferentemente un PEG de masa molecular nominal de aproximadamente entre 3350 Da y 4000 Da y lo más preferente es PEG de 4000 Da de masa molecular nominal.

60 El contenido de poliéter o polímero de glicol mencionado anteriormente en la solución inicial de inmunoglobulinas es, preferentemente, entre 2 % y 6 % (p/v), más preferentemente entre 3 % y 5 % (p/v).

65 Se contempla que es posible que sea necesario un ajuste de la concentración de dicho poliéter o polímero de glicol en la solución inicial de inmunoglobulinas. Dicho ajuste de la concentración de dicho poliéter o polímero de glicol se puede realizar por dilución de la solución de inmunoglobulinas purificada inicial y/o por adición del mismo.

En función de la composición de la solución inicial de inmunoglobulinas se contempla que, antes de la etapa a) del procedimiento de la presente invención se realicen una serie de etapas de purificación o ajuste de concentraciones, tales como, por ejemplo:

- ajuste de la concentración de inmunoglobulinas preferentemente entre 1 y 10 mg/ml, más preferentemente entre 3 y 7 mg/ml. Este ajuste se puede realizar por cualquiera de los procedimientos conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, por dilución o concentración de la proteína hasta el rango establecido (determinada, por ejemplo, según proteína total por densidad óptica a 280 nm $E(1\%) = 13,8 - 14,0$ UA, por el método de Biuret, por el método de Bradford, o específicamente por inmunonefelometría), según el caso. Por tanto, en una realización preferente, la solución inicial de inmunoglobulinas presenta una concentración de inmunoglobulinas preferentemente entre 1 y 10 mg/ml, más preferentemente entre 3 y 7 mg/ml; y/o

- ajuste de la pureza de la solución de inmunoglobulinas que, preferentemente, ha de alcanzar al menos el 96 % de IgG con respecto al total de proteína. Esta purificación se puede llevar a cabo por técnicas ampliamente conocidas por el experto en la materia como, por ejemplo, por precipitación con PEG, y filtración y posterior cromatografía de intercambio aniónico (DEAE Sepharose).

En la etapa a) del procedimiento de la presente invención se añade ácido caprílico o sales del mismo, preferentemente utilizando una solución concentrada del mismo, por ejemplo entre 1,5M y 2,5M, hasta una concentración final preferentemente entre 9 mM y 15 mM.

En una realización preferente, en la etapa b), la solución obtenida se ajusta a un pH entre 5,0 y 5,2, más preferentemente a 5,1.

En una realización preferente, en la etapa c), la solución obtenida se incuba, al menos 10 minutos, más preferentemente entre 1 y 2 horas, y aún más preferentemente 2 horas. Adicionalmente, la temperatura a la que se realiza dicha incubación está entre 2 °C y 37 °C, más preferentemente entre 20 °C y 30 °C.

En una realización preferente, antes de la etapa d) del procedimiento de la presente invención, el contenido de polímeros o agregados de alto peso molecular en la solución obtenida en dicha etapa c) es inferior o igual al 0,2 %, más preferentemente es inferior a 0,1 %. Este porcentaje de polímeros o agregados moleculares de inmunoglobulinas respecto al total de proteínas, se determina mediante HPLC en columna de exclusión en gel según el valor de densidad óptica a 280 nm. Dicho porcentaje de polímeros o agregados moleculares de inmunoglobulinas puede evaluarse, por ejemplo, con el método de análisis descrito en la monografía de la gammaglobulina intravenosa de la Farmacopea Europea.

Preferentemente, la solución de inmunoglobulinas es clarificada utilizando filtros de profundidad antes de llevar a cabo la etapa d) de ultrafiltración/diafiltración.

Respecto a la etapa d), se contempla, de forma preferente, que la ultrafiltración/diafiltración en el procedimiento de la presente invención presente etapas iniciales de diafiltración y concentración por reducción de volumen, para posteriormente aplicar la diafiltración a volumen constante.

La ultrafiltración/diafiltración puede llevarse a cabo a escala industrial preferentemente por medio del procedimiento de diálisis y concentración simultánea, reduciendo el volumen de producto y diafiltrando a su vez, de forma que el consumo de reactivos sea algo menor y el proceso más eficiente, teniendo en cuenta que la concentración de proteínas sea la óptima y preferentemente inferior o igual a 30 mg/ml. De todos modos, el experto en la materia puede determinar fácilmente la forma más adecuada y práctica de llevar a cabo esta etapa de ultrafiltración/diafiltración, eligiendo entre los distintos modos operativos conocidos en el estado de la técnica (por ejemplo, dilución-concentración o diafiltración-concentración, diafiltración a volumen constante, o modificaciones y combinación de las anteriores).

La membrana de ultrafiltración/diafiltración utilizada en la etapa d) del procedimiento de la presente invención está formada preferentemente por polisulfona, celulosa regenerada, o equivalentes, tales como, por ejemplo, las membranas comercializadas bajo las marcas Biomax® (Millipore, EE.UU.), Omega® (Pall, EE.UU.), Kvik-flow® (General Electric, EE.UU.). No obstante, el corte molecular elegido para la membrana puede variar dependiendo de diversos factores, por ejemplo, del fabricante de elección. El experto en la materia puede determinar fácilmente la membrana de elección que se ajusta a las necesidades de cada caso según, por ejemplo, la concentración de caprilato y del poliéter o polímero de glicol de la solución a procesar.

De forma preferente, la etapa d) de ultrafiltración/diafiltración se lleva a cabo a través de una membrana de corte molecular inferior o igual a 100 kDa, aún más preferentemente de 100 kDa.

En la realización más preferente, la ultrafiltración/diafiltración de la etapa d) se realiza en dos fases:

una primera fase en la que el pH se ajusta entre 5,0 y 6,0 para reducir o eliminar mayoritariamente el caprilato y una segunda fase en la que el pH se ajusta por debajo de 5,0, preferentemente a un pH entre 4,0 y 5,0, para la reducir o eliminar mayoritariamente el poliéter o polímero de glicol.

5 En una realización preferente, en la primera fase de la etapa de ultrafiltración/diafiltración, la diafiltración se lleva a cabo utilizando un medio de diafiltración que comprende sales alcalinas de ácido carboxílico, por ejemplo del ácido acético, a una concentración superior o igual a 5 mM aproximadamente. En la realización más preferente, la diafiltración mencionada se realiza utilizando una solución de acetato sódico a una concentración superior o igual a 5 mM ajustada al pH mencionado anteriormente, es decir, entre 5,0 y 6,0.

10 El número de volúmenes de diafiltración a realizar en la primera fase de la etapa d) de ultrafiltración/diafiltración lo puede determinar fácilmente el experto en la materia en función de la cantidad de caprilato utilizada inicialmente y la cantidad final aceptable. Preferentemente, se utilizan al menos tres volúmenes del medio de diafiltración que, tal y como se ha mencionado anteriormente, preferentemente es solución de acetato sódico 5 mM a pH 5,0-6,0. De forma
15 preferente, en esta primera fase de la ultrafiltración/diafiltración se elimina aproximadamente el 90 % o más del caprilato inicial, de manera que en esta primera fase la concentración de caprilato se reduce a aproximadamente 1 mM o inferior.

En la segunda fase de la etapa d) de ultrafiltración/diafiltración se procede a realizar la diafiltración de la solución de inmunoglobulinas, preferentemente, a volumen constante.

20 De forma preferente, la diafiltración en dicha segunda fase de la ultrafiltración/diafiltración se realiza frente a una solución tamponada que contiene sales de metal alcalino formadas por acetato, fosfato, o equivalentes, o aminoácidos y/o polioles, por ejemplo, glicina y/o sorbitol al valor de pH indicado anteriormente.

25 Como en el caso de la primera fase de la diafiltración, en la segunda fase el número de volúmenes de diálisis utilizados para reducir convenientemente el poliéter o polímero de glicol utilizado en el procedimiento de la presente invención pueden ser determinados fácilmente por un experto en la materia teniendo en cuenta la reducción o eliminación requerida del poliéter o polímero de glicol. En una realización preferente, la cantidad de tampón a intercambiar en la diafiltración de la segunda fase de la etapa d) de ultrafiltración/diafiltración es igual o superior a seis volúmenes. En la
30 realización más preferente, en dicha segunda fase, el intercambio se realiza frente al número de volúmenes de tampón necesarios para obtener una reducción del poliéter o polímero de glicol igual o superior a 100 veces del contenido inicial de dicho poliéter o polímero de glicol antes de iniciar la etapa d) de ultrafiltración/diafiltración.

Una vez reducidos el caprilato y el poliéter o polímero de glicol en la etapa d) de ultrafiltración/diafiltración, en la
35 etapa de formulación final mencionada anteriormente puede ajustarse la solución a la composición final deseada por adición de los excipientes y/o estabilizantes requeridos, de forma que pueda concentrarse el producto para llevarlo a la formulación final. La adición de los excipientes y/o estabilizantes para llevar a cabo posteriormente la formulación final puede realizarse directamente añadiendo dichos excipientes y/o estabilizantes en forma sólida o de solución concentrada o, aún más preferentemente, mediante diafiltración empleando el número de volúmenes de intercambio
40 necesarios de una solución de formulación para asegurar la adecuada composición del producto final.

En otra realización, la adición de los excipientes y/o estabilizantes se lleva a cabo sustituyendo la solución tampón de diálisis formada por acetato sódico utilizada en la segunda fase de la etapa d) de ultrafiltración/diafiltración, total o
45 parcialmente, por una solución que comprenda los excipientes y/o estabilizantes a añadir ajustada, preferentemente, al mismo valor de pH de entre 4,0 y 5,0 de manera que después de la concentración final la inmunoglobulina ya quede formulada.

Un experto en la materia conoce que tipos de excipientes y/o estabilizantes se deben añadir para lograr una
50 estabilidad deseada. Se contempla, por ejemplo, que dichos excipientes y/o estabilizantes sean uno o más aminoácidos, por ejemplo, glicina, preferentemente a una concentración de entre 0,2 y 0,3 M; uno o más carbohidratos o polioles, por ejemplo sorbitol; o combinaciones de los mismos.

Finalmente, la concentración final de inmunoglobulinas, preferentemente IgGs, se ajusta, a una concentración adecuada para su uso intravenoso, intramuscular o subcutáneo, las cuales son conocidas por un experto en la
55 materia y, por ejemplo, puede estar entre el 5 % y 22 % (p/v). Dicha concentración se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica, por ejemplo, por concentración mediante ultrafiltración. Se contempla que en caso de que la concentración de las inmunoglobulinas se lleve a cabo mediante ultrafiltración, dicha concentración se puede realizar utilizando la misma membrana que en la diafiltración previa. Evidentemente, las tres diafiltraciones mencionadas, así como la concentración, también se pueden llevar a cabo utilizando
60 diferentes membranas.

El procedimiento de la presente invención también contempla la posibilidad de introducir una etapa de nanofiltración para aumentar el margen de seguridad del producto. Existen distintas fases del procedimiento en que el producto es nanofiltrable por filtros disponibles comercialmente (por ejemplo, Planova® y Bioex® de Asahi-Kasei, DV® y SV4®
65 de Pall, Virosart® de Sartorius, Vpro® de Millipore, o equivalentes) con tamaños de poro desde 20 nm o inferiores y hasta 50 nm, preferentemente con tamaños de poro de 20 nm o inferiores, o incluso se pueden utilizar nanofiltros de 15 nm. Las etapas intermedias en las que puede llevarse a cabo una etapa de nanofiltración, son, por ejemplo, en la

solución inicial de inmunoglobulinas; o en el material tratado con caprilato después de la etapa de ultrafiltración/diafiltración (una vez reducidos el caprilato y el poliéter o polímero de glicol); o el material después de concentrar y formular la solución de inmunoglobulinas, preferentemente IgGs (producto final). El experto en la materia escogerá la mejor opción en función de, entre otros, el tamaño de poro de la membrana, área de filtración requerida según el tiempo del procedimiento, volumen de producto a nanofiltrar, recuperación de proteína.

El producto final obtenido por el procedimiento de la presente invención cumple totalmente con los criterios de la Farmacopea Europea en relación con el contenido de isohemaglutininas. Sin embargo, el procedimiento de la presente invención también contempla la opción de incluir una etapa de captura selectiva y específica de anticuerpos de grupo sanguíneo anti-A y/o anti-B para maximizar su reducción. Dicha etapa se lleva a cabo, preferentemente, utilizando resinas de afinidad bioespecífica, tal y como se ha descrito en el estado de la técnica. Por ejemplo, utilizando resinas de afinidad bioespecífica con ligandos formados por trisacáridos puede conseguirse una reducción significativa del nivel de isohemaglutininas (Spalter y otros, Blood, 1999, 93, 4418-4424). Esta captura adicional puede incorporarse opcionalmente, según el criterio del experto en la materia, y en cualquier etapa del procedimiento de la presente invención, o puede realizarse antes o después de llevar a cabo el procedimiento de la presente invención.

Por tanto, respecto al procedimiento de preparación de una solución de inmunoglobulinas de la presente invención, en la realización más preferente se utiliza una solución inicial de inmunoglobulinas con una pureza superior o igual al 96 % de IgGs. Esta solución se ajusta a una concentración de IgGs preferentemente de entre 1 mg/ml y 10 mg/ml, y preferentemente entre 3 mg/ml y 7 mg/ml, la cual contiene (por adición en etapas previas) o se le añade PEG hasta una concentración del 4 ± 1 % (p/v). A continuación, se ajusta el pH de la solución a entre 5,0 y 5,2 con ácido acético, y se le añade caprilato sódico (por ejemplo, utilizando una en solución concentrada de dicho caprilato sódico). En la realización preferente, la solución de caprilato concentrada se añade a la solución de IgGs purificada, lentamente y con agitación. Después de adicionar todo el caprilato calculado para llevar el producto a la concentración final de entre 9 y 15 mM de caprilato, si fuese necesario, se vuelve a ajustar el pH final entre 5,0 y 5,2, se incuba la solución preferentemente a una temperatura entre 2-37 °C y más preferentemente a una temperatura de 25 ± 5 °C un tiempo mínimo 10 min, y preferentemente entre 1 y 2 horas.

Posteriormente, se clarifica por filtros de profundidad (por ejemplo, Cuno 90LA, 50LA, Seitz EK, EK-1, EKS, o equivalentes).

A continuación, la solución obtenida se procesa a través de un equipo de ultrafiltración/diafiltración formado por membranas compuestas por polisulfona, por ejemplo, Biomax® de Millipore u Omega® de Pall, preferentemente, colocadas en forma de cassette apilable. La solución se recircula por cada unidad de ultrafiltración/diafiltración, preferentemente, a un caudal de entre 100-500 L/h aproximadamente y a una temperatura de 5 ± 3 °C. La pérdida de carga entre la presión de entrada y la de salida (presión atmosférica) es, preferentemente, entre 1 y 3 bar. Seguidamente, se inicia la primera fase de diafiltración de la etapa de ultrafiltración/diafiltración para eliminar el caprilato, aplicando preferentemente un intercambio de al menos tres volúmenes de tampón formado preferentemente por una solución de acetato sódico a una concentración igual o mayor a 5 mM y a pH entre 5,0 y 6,0. Preferentemente, a cada volumen de tampón añadido o consumido se reduce el volumen de la solución de producto a la mitad del inicial, excepto en la última adición.

Tras la primera fase de diafiltración (por dilución y concentración o equivalente) se ajusta el pH de la solución retenida a entre 4,0 y 5,0 con, por ejemplo, ácido acético. Luego, se inicia la diafiltración a volumen constante, preferentemente, frente a seis o más volúmenes de una solución tampón formada por acetato sódico a una concentración igual o superior a 5 mM y a pH entre 4,0 y 5,0.

La anterior solución tampón de diálisis formada por acetato sódico puede opcionalmente sustituirse total o parcialmente por una solución de aminoácido/s, por ejemplo, glicina a una concentración de 0,2-0,3 M, opcionalmente combinada con carbohidratos o polioles, por ejemplo sorbitol, ajustada preferentemente al mismo valor de pH de entre 4,0 y 5,0 de manera que después de la concentración final la inmunoglobulina ya quede formulada.

Después de aplicar, preferentemente, al menos seis volúmenes (más preferentemente entre seis y diez volúmenes) de las soluciones de diálisis a pH entre 4,0 y 5,0 mencionadas anteriormente el producto puede formularse, en el caso en que no lo esté, por adición directa de excipiente/s y/o estabilizante/s a la solución obtenida, como, por ejemplo, glicina u otros aminoácidos, así como carbohidratos, por ejemplo, sorbitol, o combinación de los mismos, en estado sólido o en forma de solución concentrada de dichos excipiente/s y/o estabilizante/s. A continuación, se procede a concentrar la solución de IgGs obtenida mediante reducción de volumen hasta llevar la concentración de IgG hasta valores adecuados para su uso intravenoso, intramuscular o subcutáneo.

Dicha solución concentrada, apropiadamente ajustada respecto a la concentración de excipiente/s y/o estabilizante/s y el pH, se aplica por una filtración absoluta utilizando filtros de 0,2 µm de poro, y, opcionalmente, se nanofiltrar. Finalmente, la solución de IgGs se dosifica asépticamente en inyectables, ampollas, viales, botellas u otros frascos de vidrio, cerrándose luego los mismos herméticamente. Otra opción es la dosificación en envases de plástico compatibles, rígidos o flexibles, por ejemplo bolsas o botellas.

El producto dosificado pasa cuarentena e inspección visual, almacenándose a una temperatura entre 2 y 30 °C para su conservación hasta al menos 2 años.

- 5 La presente invención se describe a continuación con más detalles en referencia a varios ejemplos de realización. Estos ejemplos, sin embargo, no están destinados a limitar el alcance de la presente invención, sino a ilustrar la descripción de la misma.

EJEMPLOS

- 10 Ejemplo 1. Procedimiento según la presente invención de obtención, a partir de plasma, de una solución de inmunoglobulinas viralmente segura, libre de agregados y con un rendimiento adecuado para su aplicación industrial.

Se tomaron como material de partida 16 litros de una solución de inmunoglobulinas, que contenía IgGs como componente proteico mayoritario, obtenida según el procedimiento descrito en la Patente Europea EP1225180B1. En resumen, dicha solución se obtuvo a partir de la extracción de gammaglobulina de la Fracción II+III del método de Cohn. Para llevar a cabo dicha extracción de gammaglobulina de la Fracción II+III, dicha fracción fue previamente aislada por fraccionamiento de plasma humano con etanol. A continuación se suspendió en presencia de un carbohidrato, y se le redujo el contenido de proteínas acompañantes mayoritarias mediante precipitación con PEG-4000. Finalmente se llevó a cabo la purificación final de la fracción por adsorción a una columna de resinas de intercambio iónico (DEAE Sepharose). El efluente de columna así obtenido (fracción no adsorbida a la resina, es decir, al DEAE), presentó pureza electroforética en acetato de celulosa (ACE) de las inmunoglobulinas del $98 \pm 2 \%$, un pH de 6,0, un valor de turbidez de 2,6 Unidades de Turbidez Nefelométrica (NTU, por sus siglas en inglés) y una concentración de IgG de aproximadamente 5 mg/ml.

- 25 La solución obtenida se ajustó a pH 5,1 y a temperatura entre 2 y 8 °C por adición de ácido acético. Posteriormente, dicha solución de inmunoglobulina se llevó a una concentración final de caprilato de 13 mM mediante la adición de una solución concentrada de caprilato sódico.

- 30 La solución de inmunoglobulinas con caprilato se calentó hasta 25 °C y se incubó a dicha temperatura durante 2 horas bajo agitación lenta. Durante dicho procedimiento de incubación el pH se mantuvo a $5,10 \pm 0,05$. La turbidez de la solución resultante fue de 17,3 NTU.

- La solución tratada con caprilato se enfrió a una temperatura aproximada de 8 °C para su clarificación posterior a través de un filtro de profundidad (CUNO®, Ultrafilter, Dinamarca). De dicha clarificación, se recogieron unos 20 litros de líquido filtrado (incluyendo el postlavado, con una concentración de IgG de aproximadamente 4 mg/ml y una turbidez inferior a 3 NTU.

- La solución clarificada anterior se dializó y concentró por ultrafiltración a través de membranas de corte molecular nominal de 100 kDa (Biomax®, Millipore, EE.UU.). La ultrafiltración se llevó a cabo en dos fases diferenciadas: en la primera fase, el material que se hallaba a pH 5,1 se sometió a tres etapas de diálisis y concentración secuencial, mediante diafiltración frente a una solución de acetato 5 mM ajustada a pH 5,1 y mediante concentración hasta aproximadamente 30 UA. En la segunda fase, la solución que presentaba una concentración adecuada de proteínas, caprilato y PEG, se llevó a pH $4,5 \pm 0,1$ y se inició posteriormente una diálisis frente a ocho volúmenes de solución de acetato 5 mM a pH 4,5. Posteriormente, el producto se formuló mediante diálisis frente aproximadamente 20 litros de solución de glicina 200 mM a pH 4,2, y se concentró en la misma unidad de ultrafiltración hasta un valor de 140,5 UA con el fin de obtener una solución de IgGs con una concentración del 10 % (p/v).

- Finalmente, dicha solución se filtró a través de un filtro de profundidad (CUNO®, Ultrafilter, Dinamarca) y de filtros o membranas absolutas de 0,22 µm de poro (CVGL®, Millipore, EE.UU.; o DFL®, PALL, EE.UU.).

- La tabla 1 muestra la caracterización del material de partida, diferentes productos intermedios y el producto final, según el procedimiento anteriormente explicado. Respecto a los resultados incluidos en dicha tabla, se indica que la turbidez se midió por nefelometría, el porcentaje de polímero o agregados moleculares de inmunoglobulinas, respecto al total de proteínas detectado, se determinó mediante HPLC en columna de exclusión en gel según el valor de densidad óptica a 280 nm; la concentración de caprilato se determinó por un método enzimático mediante cuantificación de sustrato colorimétrico, la concentración de PEG se determinó mediante columna de filtración en gel HPLC utilizando un detector de índice de refracción, y el porcentaje de recuperación del proceso se calculó según la concentración de IgG cuantificada por nefelometría.

- 60 Los resultados de este ejemplo demuestran que el tratamiento con caprilato sobredicha solución purificada no induce formación alguna de agregados de inmunoglobulinas u otros precipitados, manteniendo invariable la distribución molecular del producto. Consecuentemente, no fueron necesarias etapas de purificación posteriores al tratamiento con caprilato con el fin de eliminar agregados y/o precipitados. Este hecho facilitó enormemente el procedimiento de obtención y permitió la aplicación directa del material a la membrana de ultrafiltración.

Tabla 1. Resultados obtenidos para el material de partida, diversos productos intermedios y el producto final en el procedimiento del ejemplo 1.

Muestra	Concentración IgG (mg/ml)	Turbidez (NTU)	Agregados (Polímero/ Dímero) (%)	Concentración de caprilato (mM)	Concentración de PEG (mg/ml)	Recuperación (%)
Material de partida (Efluente de la columna de intercambio iónico, ya ajustado a pH 5,1)	4,6	2,6	<0,1/3,0	0	38,4	100
Material tratado con caprilato	4,3	17,3	<0,1/3,0	12,1	38,2	97,8
Material clarificado	3,7	2,2	<0,1/2,8	11,1	38,0	95,2
Producto final	99,1	3,5	<0,1/2,7	0,1	0,1	89,4

Así, la etapa de ultrafiltración posterior resolvió satisfactoriamente el objetivo de reducir eficientemente los reactivos químicos del proceso de fabricación (es decir, PEG y caprilato), permitiendo a su vez la posterior formulación y concentración de la solución purificada de inmunoglobulina hasta la composición adecuada para su uso terapéutico.

Tal y como se puede observar en la tabla 1, la recuperación de proteína obtenida en este caso, desde el efluente de partida hasta el producto concentrado al 10 %, fue del 89,4 %, constatándose la viabilidad de este procedimiento a nivel industrial. Dicha recuperación fue superior al valor obtenido por procedimientos convencionales según el estado de la técnica, y tal y como se describe en la solicitud de Patente PCT WO2005/073252 (70 % de recuperación, según rendimiento de 4,8 g/l con respecto a 6,8 g/l inicial).

Ejemplo 2. Influencia de la pureza de la solución de inmunoglobulinas inicial en el tratamiento con caprilato.

En este ejemplo se evaluó el impacto de la pureza de la solución de inmunoglobulinas inicial y la presencia de proteínas acompañantes en el material de partida que se somete al procedimiento de la presente invención.

Se realizaron dos grupos de ensayo experimentalmente independientes:

- En el grupo A, el material de partida fue el efluente de columna DEAE Sepharosa, de pureza electroforética (ACE) del 98±2 % de IgG, es decir, el material de partida descrito en el ejemplo 1.

- En el grupo B, el material de partida, denominado Filtrado PEG 4 %, fue obtenido por el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 1 hasta la etapa previa a la cromatografía en DEAE Sepharosa. Así, el material B se obtuvo tras la precipitación con PEG de la suspensión de extracción de la Fracción II+III y presentaba una pureza electroforética (ACE) aproximada del 90 % de IgG.

Ambos materiales de partida (grupo A y grupo B), con un contenido de PEG equivalente y aproximadamente igual al 4 %, se sometieron a un tratamiento con caprilato a una concentración de 13 mM, y a un pH entre 5,0 y 5,2 y se purificaron según lo indicado en el ejemplo 1.

En la tabla 2 se detallan las principales características del material de partida utilizado en ambos grupos de ensayo (A y B, respectivamente), así como del material generado en etapas posteriores al tratamiento con caprilato.

Tabla 2. Resultados de turbidez y porcentaje de agregación obtenidos en las diferentes etapas del procedimiento de la presente invención para los grupos A y B descritos en el ejemplo 2.

Material de partida (grupo)	Pureza (%)	Contenido de albúmina (mg Alb/g IgG)	Solución previa al tratamiento con caprilato		Solución tras adición de caprilato		Solución tras incubación (2 horas a 25 °C)	
			D.O. 280 nm (UA)	Turbidez (NTU)	Agregados, polímero (%)	Turbidez (NTU)	Agregados, polímero (%)	Turbidez (NTU)
Efluente de columna (A)	97,9 ± 1,5	<0,4	6,7	2,9	<0,1	15, 1	<0,1	17
Filtrado tras tratamiento con PEG (B)	90,2 ± 2,9	36	8,3	8	1,9	517	0,9	591
								1,0

Los resultados obtenidos y recogidos en la tabla 2 demostraron que la adición de caprilato a una concentración efectiva para la inactivación (13 mM), sobre un material de menor pureza (aproximadamente 90 % de IgG, ver grupo B), provoca la precipitación de componentes de la solución dando lugar a un incremento drástico de turbidez (superior a 500 NTU). Así, los resultados de distribución molecular de la solución, demostraron la precipitación de parte de las proteínas acompañantes de alto peso molecular.

La adición de caprilato, en las cantidades y condiciones mencionadas anteriormente (13 mM de caprilato, pH entre 5,0 y 5,2), sobre un material de baja pureza dio lugar a una suspensión precipitada que hizo necesaria la inclusión de etapas de separación y purificación adicionales para separar las proteínas de alto peso molecular y agregados precipitados. Por tanto, la composición molecular del producto del grupo A tratado con caprilato, es decir, con un contenido en agregados superior al 1 %, evidencia la inviabilidad de procesar este producto hasta producto final purificado a menos que se incluyeran etapas de purificación o separación adicionales, tales como etapas de precipitación con PEG, cromatografía o equivalentes. Finalmente, este hecho puso de manifiesto la viabilidad del uso del caprilato como agente con capacidad para inactivación viral y en condiciones no precipitantes únicamente cuando éste se adiciona a un material con pureza suficiente.

Ejemplo 3. Efecto de la composición del material de partida en la generación de agregados.

El objetivo de este experimento fue evaluar el impacto de la composición de la solución inicial de inmunoglobulinas sobre la que se aplica el tratamiento con caprilato.

Se realizaron dos grupos de ensayo experimentalmente independientes, A y B, a partir de dos materiales de pureza equivalente ($97,9 \pm 1,5$ %), pero de diferente composición.

En el grupo A, el material de partida fue el efluente de columna (obtenido de acuerdo al procedimiento inicial descrito en el ejemplo 1), con una concentración de proteínas de 5 ± 2 mg/ml y una concentración de PEG-4000 del 4 ± 1 %.

En el grupo B, el material de partida denominado efluente concentrado y dializado, fue el mismo efluente de columna mencionado para el grupo A pero una vez concentrado y dializado. Por tanto, el efluente de columna DEAE (mencionado en el ejemplo 1 anterior y que conforma el grupo A del presente ejemplo), fue sometido a una etapa adicional de diálisis y concentración mediante ultrafiltración de modo que se redujo el contenido de PEG del orden de 6 veces aproximadamente y la proteína se concentró hasta un valor aproximado de 4 %, es decir 40 mg/ml.

El material obtenido en ambos grupos experimentales, A y B, fue sometido a un tratamiento con caprilato a una concentración de 13 mM y un pH entre 5,0 y 5,2 y fue ultrafiltrado en las condiciones descritas en el ejemplo 1 hasta la obtención de un producto de IgGs concentrado al 10 %.

En la tabla 3 se detallan las principales características del material procesado en los grupos experimentales A y B mencionados anteriormente así como las características del material generado en la etapa posterior al tratamiento con caprilato y en el producto final diafiltrado y concentrado, para cada grupo experimental.

Tabla 3. Resultados obtenidos para las diferentes etapas del procedimiento de la presente invención en los grupos A y B del ejemplo 3.

Material de partida (grupo)	Material de partida			Caprilato nominal (mM)	Solución tras adición de caprilato			Producto final concentrado	
	IgG (mg/ml)	PEG (mg/ml)	Pureza (%)		Turbidez (NTU)	Agregados, polímero (%)	Caprilato (mM)	Agregados, polímero (%)	
Efluente de columna (A)	5 ± 2	40 ± 10	97,9 ± 1,5	13	7,0	<0,1	<0,1	<0,1	
					9,8	<0,1	0,1	<0,1	
					11,9	<0,1	0,1	<0,1	
Efluente concentrado y dializado (B)	~ 40	~ 6	98 ± 2	13	11,9	0,5	0,3	0,3	
					13,4	0,4	0,5	0,5	
					10,0	0,3	0,5	0,4	

Tal y como se puede ver en la tabla 3, los resultados demuestran que el tratamiento con caprilato en las condiciones especificadas, sobre una solución purificada de inmunoglobulina, a una concentración de 5 ± 2 mg/ml, y en presencia de una concentración de PEG de 40 ± 10 mg/ml (4 ± 1 %) (grupo A, efluente de columna), no induce alteración o agregación de la solución de inmunoglobulinas, manteniéndose invariable la distribución molecular del producto durante y tras la adición del caprilato, con una proporción no detectable de agregados inferior al 0,1 %.

Sin embargo, cuando estas mismas condiciones para el tratamiento con caprilato se aplicaron a un material con un reducido contenido de PEG (< 1 %) (grupo B), se observó un notable incremento de agregados de inmunoglobulina tras la adición de caprilato. Además, este contenido de agregados no fue eliminable por ultrafiltración en las condiciones utilizadas, cuantificándose niveles comparables de polímero en el producto final.

Dado que las características diferenciales entre el material de partida utilizado en los grupos experimentales A y B, eran principalmente la concentración de proteína y la concentración de PEG, se realizó un ensayo adicional con objeto de comprobar la influencia de cada uno de dichos parámetros en el posterior tratamiento con caprilato.

En este experimento se partió de un único lote de Efluente Concentrado y Dializado (material inicial del anterior grupo B) que se separó en cuatro grupos experimentalmente distintos: grupos B1, B2, B3 y B4.

El material del grupo B1, se procesó a una concentración aproximada de proteína de 4 % y a una concentración de PEG aproximada de 0,6 %.

El material del grupo B2, se procesó a la misma concentración de proteína de aproximadamente el 4 %, pero se reajustó el contenido de PEG hasta un valor de 4 ± 1 % (p/p).

En los grupos B3 y B4, el material se diluyó hasta un $0,5 \pm 0,2$ % de proteína. En cuanto al contenido de PEG, en el grupo B3 dicho contenido se llevó a una concentración del 0,6 % (p/p) aproximadamente, mientras que en el grupo B4 el contenido de PEG se reajustó hasta el 4 ± 1 % (p/p).

El material resultante obtenido en los cuatro grupos experimentales, se llevó a pH $5,10 \pm 0,05$ y a una concentración de caprilato de 15 mM y, a continuación, se incubó a 25 °C durante 2 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados obtenidos para el material inicial y tras la incubación con caprilato para los grupos B1, B2, B3 y B4 del ejemplo 3.

Grupo experimental	Material de Partida				Solución tratado con caprilato 15mM a 25 °C durante 2 horas
	IgG (mg/ml)	PEG (mg/ml)	Turbidez (NTU)	Agregados, polímero (%)	Agregados, Polímero (%)
B1	~ 40	~ 6	1,6	< 0,1	0,5
B2	~ 40	40 ± 6	2,5	< 0,1	0,3
B3	5 ± 2	~ 6	1,3	< 0,1	0,5
B4	5 ± 2	40 ± 6	1,3	< 0,1	< 0,1

Los resultados mostrados en la tabla 4 constatan que durante el tratamiento con caprilato en las condiciones establecidas se observó un efecto protector del PEG en combinación con una suficiente dilución de la proteína. Resulta destacable que cuando el material de partida se halló a una concentración aproximada de proteína de 5 ± 2 mg/ml y a una concentración de PEG de 4 %, se obtuvieron valores no detectables de agregados tras el tratamiento con caprilato ($< 0,1$ %).

Ejemplo 4. Efecto del pH en la solubilidad de la solución de inmunoglobulinas tratada con caprilato.

Es conocido que la eliminación del PEG en soluciones de inmunoglobulinas, así como la concentración de dichas inmunoglobulinas hasta concentraciones adecuadas para su uso intravenoso, debe tener lugar preferentemente a valores de pH próximos a 4,5.

Por otro lado, dada la insolubilidad del ácido caprílico a pHs inferiores a su pKa (4,89), en el presente experimento se evaluó el efecto del pH en la solubilidad de la solución de inmunoglobulinas tratada con caprilato, con el objeto de establecer un valor de pH adecuado para iniciar su ultrafiltración.

Para ello, se procesó un lote de efluente de columna obtenido de acuerdo al procedimiento inicial detallado en el ejemplo 1 hasta la obtención de la solución de inmunoglobulinas tratada con caprilato 13 mM y clarificada.

Este intermedio, que constituye el material previo a la etapa de ultrafiltración, fue acidificado mediante la adición de ácido acético desde el pH del tratamiento con caprilato (5,1) hasta valores de pH próximos a 4,5. Posteriormente, se evaluó el aspecto y solubilidad de la solución para cada uno de los pHs evaluados y se cuantificó la generación de partículas coloidales por medida nefelométrica de la turbidez.

5

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos de aspecto y turbidez obtenidos para cada uno de los pHs evaluados.

Tabla 5. Resultados de turbidez y aspecto visual obtenidos para los diferentes pHs analizados en el ejemplo 4.

pH	Turbidez (NTU)	Aspecto visual
5,1	5,6	Transparente
5,0	10,0	Transparente, pequeños cristales
4,8	32,5	Blanco, cristales precipitados
4,6	53,0	Blanco, cristales precipitados
4,4	57,1	Blanco, cristales precipitados

10 Los resultados obtenidos y que se muestran en la tabla 5 demostraron que al acidificar la solución de inmunoglobulinas tratada con 13 mM de caprilato, por debajo de pH 5,0 se observó la aparición de un precipitado blanquecino, y un claro incremento de turbidez. Este efecto muy probablemente se debió a la formación de ácido caprílico insoluble en forma coloidal, lo cual haría inviable iniciar el proceso de ultrafiltración a valores de pH inferiores a 5,0.

15 Los resultados obtenidos mostraron que al someter la solución purificada de inmunoglobulinas a un tratamiento con caprilato, en el rango de concentración efectivo para la inactivación vírica (entre 9-15 mM de caprilato) y en las condiciones descritas anteriormente, es preferible iniciar la subsiguiente etapa de ultrafiltración a un pH superior o igual al pH del tratamiento de inactivación viral, es decir, 5,1, con el objetivo de aumentar la concentración de la forma ionizada y soluble del caprilato, facilitando, por tanto, su permeabilidad a través de la membrana de ultrafiltración.

20 Ejemplo 5. Efecto del contenido de acetato en la solución de diálisis en la reducción del caprilato por ultrafiltración/diafiltración.

Se realizaron una serie de procesos de ultrafiltración/diafiltración independientes entre sí y en presencia de diferentes concentraciones de acetato en la solución tampón utilizada para la diálisis del producto.

25 El material de partida utilizado, denominado efluente concentrado y dializado, es el mismo que el del grupo B del ejemplo 3. Dicho material de partida, con una pureza del 98 ± 2 % de IgG, una concentración aproximada de proteína de 40 mg/ml, y un contenido aproximado de PEG de 0,6 %, se sometió a un tratamiento con caprilato y, seguidamente, se sometió a ultrafiltración/diafiltración a través de membranas de corte molecular nominal de aproximadamente 100 kDa.

30 La etapa de ultrafiltración/diafiltración aplicada comprendió una primera fase de concentración hasta aproximadamente un 4 % (p/v) de IgG, una segunda fase de diálisis frente a ocho volúmenes de solución de diálisis y, finalmente, una concentración hasta un valor aproximado de 9-10 % (p/v) de IgGs.

35 La primera de las pruebas de ultrafiltración/diafiltración fue realizada frente a agua para inyección, mientras que las siguientes pruebas fueron llevadas a cabo utilizando soluciones tampón con concentraciones crecientes de acetato, más concretamente 2, 5, 20 o 50 mM de acetato respectivamente, y a un pH ajustado entre 5,0 y 5,5 en todos los casos.

Tabla 6. Resultados obtenidos para la etapa de ultrafiltración/diafiltración utilizando diferentes concentraciones de acetato en el tampón de diálisis.

Concentración de acetato presente en el tampón de diálisis (mM)	Adición nominal de caprilato (mM)	Producto dializado	
		Caprilato en el producto dializado (mM) ⁽¹⁾	Permeabilidad del caprilato ⁽²⁾
0	20	2,3	13,2
2	13	0,6	19,3
5	13	<0,2	32,8
20	13	<0,2	43,3
50	13	0,2	45,3

(1) Valores determinados tras dializar frente a 8 volúmenes de diálisis

(2) Permeabilidad calculada mediante la siguiente fórmula:

Número Volúmenes de Diálisis = $\ln(C_f/C_o)/(R-1)$; donde C_f es la concentración tras dializar mediante el número de diálisis en cuestión; C_o es la concentración antes de dializar y R es el coeficiente de retención.

Los resultados de la tabla 6 muestran como el procedimiento de ultrafiltración/diafiltración a través de membranas de aproximadamente 100 kDa de corte molecular, aplicando 8 volúmenes de diálisis de una solución tampón con acetato, a un pH entre 5,0 y 5,5, y con una concentración mínima de acetato en torno a 5 mM y por lo menos hasta 50 mM, resuelve satisfactoriamente el objetivo de reducir eficientemente el caprilato hasta niveles apropiados en el producto final concentrado.

En cambio, cuando la solución que se utilizó para la diálisis fue agua para inyección o una solución tampón con niveles de acetato de 2 mM, el caprilato no se eliminó eficazmente en el filtrado.

Se pone de manifiesto que el procedimiento de ultrafiltración/diafiltración a través de membrana de aproximadamente 100 kDa de corte molecular, en las condiciones descritas anteriormente, resulta efectivo en la reducción del caprilato procedente del tratamiento previo, dado que se detectaron niveles correctos de dicho reactivo en el producto final concentrado.

Ejemplo 6. Eliminación simultánea de los reactivos químicos (PEG y caprilato) mediante una única etapa de ultrafiltración.

Se procesó un lote de IgGs de acuerdo al procedimiento descrito en el ejemplo 1 hasta la solución inactivada con caprilato y clarificada. Dicha solución, con una concentración de proteína aproximada de 0,5 % y a pH 5,1, se procesó a través de un equipo de ultrafiltración/diafiltración formado por membranas de polisulfona tipo Biomax® (Millipore, EE.UU.), de 100 kDa de corte molecular. La ultrafiltración/diafiltración se llevó a cabo en dos fases diferenciadas, tal y como se ha descrito en el ejemplo 5:

- En la primera fase, llevada a cabo a pH 5,1, 5,6 o 5,8, el material se sometió a etapas de diálisis y concentración secuencial, mediante diafiltración frente a no menos de tres volúmenes de solución tampón de acetato 5 mM ajustada a pH 5,1, 5,6 o 5,8, y concentrando la proteína hasta un valor aproximado del 2 %.

- En la segunda fase, y una vez que el contenido de caprilato se redujo aproximadamente una décima parte, la solución se llevó a pH 4,5 $\pm$ 0,1 o 5,1. Posteriormente, el producto se llevó hasta una concentración adecuada de proteína y PEG para iniciar la diálisis, y se inició la diálisis mediante ocho volúmenes de solución tampón de acetato 5 mM a pH 4,5 o pH 5,1.

Finalmente, el producto se formuló mediante diálisis frente a seis volúmenes de solución de Glicina a una concentración 200 mM y con un pH de 4,2 y se concentró con el fin de obtener una solución de IgGs al 10 %.

En la tabla 7 se muestra el porcentaje de pasaje de PEG y de caprilato obtenido al inicio de cada una de las fases de la ultrafiltración/diafiltración y a diferentes pHs:

Tabla 7. Pasaje de PEG y de caprilato en las dos fases de la etapa de ultrafiltración/diafiltración a los diferentes pHs analizados.

Fase (Concentración de caprilato)	pH	Pasaje PEG (%)	Pasaje caprilato (%)
Inicio de Fase I (13 mM)	5,1	17	74
	5,6	15	98
	5,8	15	100
Inicio de Fase II (1 mM)	5,1	40	100
	4,5	82	97

Los resultados de la tabla 7 muestran que al inicio de la etapa de ultrafiltración/diafiltración, en la Fase I, el caprilato presentó unos valores de pasaje muy elevados desde pH 5,1 y hasta pH 5,8. Estos valores condujeron a una reducción muy elevada del caprilato durante dicha Fase I de la etapa de ultrafiltración/diafiltración (se obtuvo una reducción del caprilato de más de 10 veces respecto a su contenido inicial). Al contrario, el pasaje de PEG fue muy discreto (<20 %) en dicha Fase I, resultando prácticamente inviable su eliminación total a pH>5 en presencia de caprilato.

Por otro lado, en la Fase II, tal y como se puede ver en la tabla 7, se comprobó que el pasaje de PEG fue muy elevado a pH 4,5, con un valor del 82 %. Adicionalmente, se comprobó que durante esta Fase II también se reduce el caprilato dado que, al inicio de la misma, éste se halla a un nivel residual $\leq$ 1 mM, lo cual facilita que el pasaje sea prácticamente del 100 %.

En la tabla 8 se detalla la evolución de la concentración de proteína, PEG y caprilato en cada una de las fases de la etapa de ultrafiltración/diafiltración y en la etapa final de formulación.

Tabla 8. Cantidad de PEG y caprilato (medidas por concentración y densidad óptica) en la solución tras la etapa de inactivación viral, las Fases I y II de la etapa de ultrafiltración/diafiltración, la formulación a pH 4,2 y en la solución final.

Fase/Etapa	PEG (mg/ml)	PEG (D.O. 280 nm)	Caprilato (mM)	Caprilato (D.O. 280 nm)
Solución inactivada y clarificada	38	6,9	12	2,2
Solución al final de la Fase I de la etapa de ultrafiltración/ diafiltración	45	1,8	0,9	0,04
Solución al final de la Fase II de la etapa de ultrafiltración/ diafiltración	0,7	0,02	0,1	0,003
Solución formulada a pH 4,2	0,1	0,003	<0,1	<0,003
Solución final concentrada	0,1	0,001	<0,1	<0,001

De acuerdo a los valores hallados de PEG y caprilato en cada etapa y fase y considerando la concentración de proteína de cada etapa, el factor de reducción de PEG fue de 4 en la Fase I (a pH 5,1) de la etapa de ultrafiltración/diafiltración y de 90 en la Fase II (a pH 4,5) de la etapa de ultrafiltración/diafiltración, lo cual supuso un factor de reducción total (Fase I y Fase II) de aproximadamente 350 veces (una absorbancia de 6,9 inicial frente a una absorbancia de 0,02 obtenida al final de la etapa de ultrafiltración/diafiltración).

En el caso del caprilato, el factor de reducción fue de 55 en la Fase I (a pH 5,1) de la etapa de ultrafiltración/diafiltración y de 13 en la Fase II (a pH 4,5) de la etapa de ultrafiltración/diafiltración, lo cual supuso un factor de reducción total (Fase I y Fase II) de aproximadamente 700 veces (una absorbancia inicial de 2,2 frente a una absorbancia de 0,003 obtenida al final de la etapa de ultrafiltración/diafiltración).

Los resultados mostraron como el reactivo con capacidad de inactivación viral (ácido caprílico o caprilato) así como el reactivo de precipitación (PEG) pudieron ser eficientemente reducidos mediante una única etapa de ultrafiltración a través de membrana de corte molecular nominal de aproximadamente 100 kDa, seleccionando las condiciones físicas y químicas a aplicar en cada fase de la etapa de ultrafiltración/diafiltración (entre otros, pH, concentración de proteína, número de volúmenes de diálisis, tampón de diálisis) y dando lugar a un producto final de IgGs concentrado al 10 % con unas concentraciones remanentes de ambos reactivos adecuadas para su uso intravenoso.

Ejemplo 7. Evaluación de la capacidad de inactivación viral del tratamiento con caprilato en presencia de PEG.

Se realizaron varios experimentos independientes tomando como material de partida el efluente de columna o bien el efluente dializado y concentrado (obtenidos de acuerdo a los ejemplos 1 y 3, respectivamente) para evaluar la capacidad de eliminación o inactivación de virus con envuelta lipídica del ácido caprílico o caprilato en presencia de PEG.

Ambos materiales presentaron una pureza de inmunoglobulina de 98 ± 2 %, una concentración de proteína entre 5 y 10 mg/ml y un contenido de PEG diferente entre sí, de 40 mg/ml o 1,5 mg/ml, respectivamente.

Se llevaron a cabo ensayos de inactivación viral utilizando el virus de la Diarrea Viral Bovina (BVDV por sus siglas en inglés) de la familia Flaviviridae, de 40-60 nm, con envoltura lipídica y con una resistencia media a agentes físico-químicos.

En cada ensayo, el material de partida correspondiente fue inoculado con el virus a razón de un valor inferior o igual al 0,5 % y fue sometido a un tratamiento de inactivación viral de dos horas y a una temperatura de 15 °C o 25 °C y aplicando unas concentraciones de caprilato de 9 mM o de 13 mM.

La cuantificación de la carga vírica del BVDV en las diferentes muestras generadas se llevó a cabo mediante el ensayo TCID₅₀ (derivado del inglés, 50 % Tissue Culture Infectious Dose) de infectividad en cultivo celular utilizando la línea celular MBDK. El factor de reducción vírica (FR) de la etapa de inactivación viral se determinó como el cociente entre la carga vírica detectada en el material de partida inoculado dividido por la cantidad de virus detectada en la muestra resultante al final del tratamiento, expresado en log₁₀.

En la tabla 9 se detallan las características del material de partida de cada ensayo, así como el FR que se obtuvo.

Tabla 9. Resultados de inactivación viral observados en los ensayos de tratamiento con caprilato con inóculo vírico, en presencia o ausencia de PEG.

Grupo experimental	Material de partida		Temperatura de tratamiento	Concentración de caprilato (nM)	Factor de reducción vírica (FR)
	IgG (mg/ml)	PEG (mg/ml)	(°C)		
Efluente dializado y concentrado	10	1,5	25	9	≥ 4,19
					≥ 4,36
				13	≥ 3,95
					≥ 4,13
Efluente de columna	5	40	25	9	≥ 4,62
					≥ 5,10
				13	≥ 4,71
					≥ 4,57
			15	13	≥ 4,32
					≥ 4,27

Los resultados de reducción vírica obtenidos en todos los ensayos (ver tabla 9) mostraron una elevada capacidad de inactivación del BVDV en ambos materiales de partida, incluso para una concentración mínima de caprilato de 9 mM, tras el tratamiento a distintas temperaturas (15 y 25 °C). Además, estos ensayos revelaron que a cualquiera de las concentraciones de PEG analizadas, no se observa interferencia por parte del PEG en la capacidad de inactivación viral del caprilato, dado que se obtuvieron resultados equivalentes con ambos materiales evaluados.

Ejemplo 8. Caracterización de la solución de inmunoglobulina intravenosa obtenida de acuerdo al procedimiento de obtención de la presente invención.

Se pretende establecer las características bioquímicas y de funcionalidad de la solución de inmunoglobulinas al 10 % (p/v) de proteínas obtenida por el procedimiento de la presente invención.

Se procesaron 2 lotes de efluente de columna DEAE de acuerdo al procedimiento detallado en el ejemplo 1, hasta la obtención de la solución inactivada de virus con caprilato, a una escala aproximada de 200 litros de plasma.

La solución con caprilato anterior, una vez clarificada, se dializó y concentró por ultrafiltración en fases diferenciadas, tal y como se ha descrito en el ejemplo 6, con el objetivo de lograr la eliminación de los principales remanentes de proceso (PEG y caprilato). Posteriormente, dicha solución purificada, y a una concentración de proteína aproximada del 2,5 %, fue formulada mediante diálisis a volumen constante frente a aproximadamente 6 volúmenes de una solución tampón compuesta por Sorbitol 1 % y Glicina 240 mM, ajustada a pH 4,5 ± 0,1. Finalmente, dicha solución se concentró por ultrafiltración y se ajustó hasta una densidad óptima de 140 ± 5 UA (280 nm), equivalente a un 10 % (p/v) de proteínas y se ajustó a un pH final de 5,25 ± 0,25.

El producto obtenido (IGIV al 10 % (p/v)) estabilizado con sorbitol y glicina, y una vez clarificado y filtrado a través de membranas de grado esterilizante (0,22 µm), fue dosificado en viales de vidrio y tapón de clorobutilo determinándose los parámetros analíticos más relevantes de la calidad, inalterabilidad y estabilidad de una solución de inmunoglobulina para administración intravenosa. Los valores analíticos promedio obtenidos para los dos lotes, así como los valores de especificaciones de la Farmacopea Europea se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Caracterización de la solución de inmunoglobulinas intravenosas al 10 % (p/v)

PARÁMETRO	PRODUCTO OBTENIDO MEDIANTE PROCEDIMIENTO DE LA INVENCION	ESPECIFICACIONES (Eur. Ph.)
pH	5,25	4,0-7,4
Osmolalidad (mOsm/kg)	306	≥ 240
Sodio (mM)	< 3,2	n.e.
Turbidez (NTU)	4,4	n.e.
Distribución molecular (%)		
Polímero	< 0,1	< 3,0 Mon.+Dim. > 90
Dímero	7,6	
Monómero	92,5	
Fracciones	< 0,3	
SubClases IgG (%)		
IgG ₁	66,7	equivalente al plasma
IgG ₂	27,6	
IgG ₃	3	
IgG ₄	2,7	
Integridad del Fragmento Fc	93	≥ 95
Perfil de pureza:		
Pureza Ig (ACE) (%)	99,6	
IgM (mg/ml)	< 0,002	
NAPTT (Dil 1/10) (s)	308	
Factor XI activado (ng/ml)	No detectado	
TGT FXI (nM Trombina)	< 53	
Título Isoglutininas		
Anti- A	Aglutinación 1:16	
Anti- B	Aglutinación 1:16	
Actividad Proteolítica	< 2	< 35
PKA (UI/ml)		
ACA (CH ₅₀ /mg)	0,6 ± 0,07	

Eur. Ph: Farmacopea Europea; n.e.: No Establecido; TGT FXI: Test Generación de Trombina (mediante plasma deficiente en Factor IX); NAPTT PKA: Activador de Precalcreína; ACA: Actividad Anticomplementaria

- 5 De los resultados anteriores se destaca que el producto obtenido está esencialmente inalterado como consecuencia del proceso de purificación de la presente invención en parámetros tales como ausencia de polímero, actividad biológica indeseable como PKA o ACA, entre otros, preservando unas características de funcionalidad intactas respecto al plasma tales como proporción de subclases de IgG, integridad fragmento Fc, y mostrando a su vez un excelente perfil de pureza (bajo título de isohemaglutininas anti-A/anti-B, concentración de IgM, actividad procoagulante, etc.).
- 10 Se concluye que el proceso global de obtención de IGIV al 10 % (p/v) de la presente invención, integrando la etapa de inactivación vírica con caprilato en presencia de PEG y su posterior separación, así como la formulación final, es totalmente viable y escalable hasta el producto final formulado y concentrado como IGIV al 10 % (p/v) de proteínas, dando lugar a un producto final que cumple perfectamente con los valores establecidos en Farmacopea Europea.
- 15 Los estudios de estabilidad llevados a cabo, imprescindibles para una viabilidad comercial del producto, mostraron la idoneidad de las formulaciones con Sorbitol (hasta un 5 %), Glicina (hasta isotonía) o combinación de ambas, en el rango de pH entre 4,2 y 6,0 para estabilizar soluciones de inmunoglobulina intravenosa al 10 % (p/v) a temperatura ambiente (25 °C-30 °C) durante dos años.
- Ejemplo 9. Aplicabilidad del tratamiento con caprilato a una fracción rica en IgG obtenida por procedimientos alternativos.
- 20 Se evalúa la validez de la aplicación del tratamiento con caprilato, en las condiciones descritas en la presente invención, sobre otros intermedios de proceso obtenidos mediante procedimientos de purificación alternativos.

Se realizaron dos experimentos independientes tomando como material de partida un intermedio plasmático rico en IgG, la denominada Suspensión de Fracción II del fraccionamiento etanólico de Cohn-Oncley.

Dicho intermedio se obtuvo mediante el mismo procedimiento de fraccionamiento plasmático descrito en la presente invención hasta la Fracción II+III. Posteriormente, el procedimiento continuó con la reprecipitación alcohólica de la suspensión de extracción de la Fracción II+III, luego se procedió a la separación de la Fracción III, obteniéndose finalmente la Fracción II, con una pureza superior al 96 %. La suspensión de dicha Fracción II, una vez purificada con Bentonita y dializada frente a agua para eliminar el contenido de alcohol, constituyó el material de partida de estos experimentos.

En los dos experimentos realizados, el material procedente de dos lotes plasmáticos se separó en dos grupos diferentes, A y B, en función de su contenido de PEG. En el grupo B, el material de partida se llevó hasta una concentración nominal de 40 mg/ml de PEG, por adición de una solución concentrada de PEG-4000.

Posteriormente, ambos materiales procedentes de ambos grupos (A y B) se diluyeron hasta una concentración de proteína aproximada de 5 mg/ml, se ajustaron a un valor de pH de 5,1, y se sometieron a un tratamiento con caprilato hasta una concentración nominal de 13 mM, y a un pH entre 5,0 y 5,2, tal y como se describe en el método de la invención.

En la tabla 11 se detallan las principales características del material de partida utilizado en ambos grupos de ensayo (A y B, respectivamente), así como las características del material generado tras el tratamiento con caprilato.

Tabla 11. Principales características del material de partida utilizado en los grupos A y B del producto final obtenido en los mismos.

La pureza de la solución inicial de inmunoglobulinas es de $99,6 \pm 0,6$ % (n= 5 lotes)

Grupo experimental	Solución previa al tratamiento con caprilato				Solución tratada con caprilato (2 horas a 25 °C)			
	PEG (mg/ml) (1)	D.O. 280 nm (UA)	Turbidez (NTU)	Agregados, polímero (%)	D.O. 280 nm (UA)	Turbidez (NTU)	Agregados, polímero (%)	Caprilato (mM) (1)
A	<0,01	6,9	3,3	<0,1	7,0	10,1	0,5	11,2
	<0,01	6,9	3,0	<0,1	7,1	16,5	1,2	11,2
B	34,1	7,1	2,5	<0,1	7,2	14,5	0,1	11,9
	33,6	6,9	3,0	<0,1	7,2	14,4	<0,1	12,4

(1) Los valores de PEG y caprilato corresponden al valor obtenido mediante determinación analítica

Los resultados constatan la viabilidad del tratamiento de inactivación con Caprilato en las condiciones especificadas, sobre una solución de inmunoglobulina suficientemente purificada por diferentes procedimientos, no induciéndose formación alguna de agregados de inmunoglobulina u otros precipitados irreversibles, lo cual facilita enormemente el proceso de purificación posterior.

Los resultados revelan que, en combinación con una suficiente dilución de la proteína y un grado de pureza suficiente, se observa el efecto protector del PEG sobre la generación de polímeros de inmunoglobulina.

Este ejemplo experimental pone de manifiesto la viabilidad del uso del caprilato únicamente como reactivo con capacidad de inactivación viral en condiciones no precipitantes y/o promotoras de agregación cuando éste es adicionado a un material con pureza suficiente y cumpliéndose las condiciones especificadas relativas a la concentración de proteína y de PEG.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de una solución de inmunoglobulinas a partir de una solución inicial de inmunoglobulinas con una pureza mayor o igual a un 96 % en presencia de un poliéter o polímero de glicol, **caracterizado por que** comprende las etapas de:
 - a) añadir ácido caprílico o sales del mismo a la solución inicial a una concentración entre 9 mM y 15 mM;
 - b) ajustar el pH de la solución obtenida en la etapa a) a un pH entre 5,0 y 5,2;
 - c) incubar la solución obtenida en la etapa b) durante un tiempo y temperatura necesarios para la inactivación de virus envueltos; y
 - d) llevar a cabo una etapa de ultrafiltración/diafiltración a la solución obtenida en la etapa c).
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho procedimiento comprende además una etapa de formulación final de la solución de inmunoglobulinas obtenida en la etapa d).
3. Procedimiento, según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** la solución inicial de inmunoglobulinas tiene su origen en la fracción I+II+III, la fracción II+III o la fracción II, obtenidas según el método de Cohn, o Cohn-Oncley, o del precipitado A o I+A o GG obtenidos por el método de Kistler-Nitschmann o variaciones de los mismos, que han sido purificadas adicionalmente hasta obtener una pureza mayor o igual a un 96 % de IgG.
4. Procedimiento, según la reivindicación 3, **caracterizado por que** la solución inicial de inmunoglobulinas tiene su origen en la fracción II+III del método de Cohn, o variaciones de la misma, que ha sido purificada posteriormente mediante precipitación con PEG y cromatografía aniónica.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la solución inicial de inmunoglobulinas presenta una concentración de inmunoglobulinas entre 1 y 10 mg/ml.
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, **caracterizado por que** la solución inicial de inmunoglobulinas presenta una concentración de inmunoglobulinas entre 3 y 7 mg/ml.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el poliéter o polímero de glicol se selecciona entre polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG) o combinaciones de los mismos.
8. Procedimiento, según la reivindicación 7, **caracterizado por que** la concentración de PEG en la solución inicial está entre 2 % y 6 % (p/v).
9. Procedimiento, según la reivindicación 7, **caracterizado por que** la concentración de PEG en la solución inicial está entre 3 % y 5 % (p/v).
10. Procedimiento según, según las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado por que** el PEG es PEG de 4000 Da de masa molecular nominal.
11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** en la etapa b) la solución obtenida se ajusta a un pH de 5,1.
12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** en la etapa c) la solución se incuba al menos 10 minutos a una temperatura entre 2 °C y 37 °C.
13. Procedimiento, según la reivindicación 12, **caracterizado por que** en la etapa c) la solución se incuba durante 2 horas a una temperatura entre 20 °C y 30 °C.
14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la solución inicial de inmunoglobulinas tiene un contenido de albúmina menor o igual al 1 % (p/v) con respecto a la proteína total.
15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la solución inicial de inmunoglobulinas proviene de plasma humano.
16. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado por que** las inmunoglobulinas de la solución inicial de inmunoglobulinas son obtenidas por métodos de genética recombinante, métodos de síntesis química o métodos de producción transgénica de la proteína o en cultivos celulares.
17. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la etapa d) de ultrafiltración/diafiltración se lleva a cabo a través de una membrana de 100 kDa.
18. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la etapa d) de ultrafiltración/diafiltración se lleva a cabo en dos fases:

- una primera fase en la que el pH se ajusta entre 5,0 y 6,0 para reducir o eliminar mayoritariamente el caprilato;
- y una segunda fase en la que el pH se ajusta a un valor inferior o igual a 5,0, para la reducir o eliminar mayoritariamente el poliéter o polímero de glicol.

5 19. Procedimiento, según la reivindicación 18, **caracterizado por que** en la segunda fase de la etapa d) de ultrafiltración/diafiltración el pH se ajusta entre 4,0 y 5,0.

10 20. Procedimiento, según la reivindicación 2, **caracterizado por que** en la etapa de formulación final se añaden excipientes y/o estabilizantes seleccionados entre uno o más aminoácidos, uno o más carbohidratos o polioles o combinaciones de los mismos.

21. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la concentración final de inmunoglobulinas se ajusta a una concentración adecuada para su uso intravenoso, intramuscular o subcutáneo.