

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 731**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/22** (2006.01)

**B01D 15/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2016 E 16187838 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3141558**

54 Título: **Medios de cromatografía de afinidad para la eliminación de anticuerpos anti-A y/o anti-B**

30 Prioridad:

**08.09.2015 US 201562215401 P**

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

**15.01.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BIAN, NANYING;  
SUN, CHIA-YUN;  
HOLSTEIN, MELISSA;  
COTONI, KRISTEN;  
STONE, MATTHEW T y  
RAHANE, SANTOSH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 737 731 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**

Medios de cromatografía de afinidad para la eliminación de anticuerpos anti-A y/o anti-B

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. Nº 62/215,401, fecha de presentación 8 de septiembre de 2015.

**Antecedentes**

10 El plasma humano enriquecido en inmunoglobulinas se usa para el tratamiento de muchos trastornos, así como para tratar ciertas deficiencias congénitas. Típicamente, el plasma humano se obtiene mezclando el plasma de múltiples donantes, con diferentes tipos de grupos sanguíneos. Los 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: tiene solo el antígeno B en los glóbulos rojos (y el anticuerpo A en el plasma); grupo sanguíneo tipo AB - tiene los antígenos A y B en los glóbulos rojos (pero ni el anticuerpo A ni el B en el plasma); y grupo sanguíneo tipo O, que 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 tiene un antígeno de un grupo sanguíneo particular, como el A, nunca entren en contacto con los anticuerpos que se unirán a este antígeno, como los anticuerpos anti-antígeno A, porque el contacto con dichos anticuerpos daría como resultado la aglutinación y/o hemólisis de sus glóbulos rojos, lo que incluso puede dar como resultado 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 tenga un grupo sanguíneo tipo O se considera un receptor universal. La compatibilidad de los diferentes grupos sanguíneos es importante para el desarrollo de transfusiones de sangre seguras y trasplantes de órganos. Sin embargo, en el caso de los fármacos terapéuticos derivados de la sangre que se basan en la mezcla de plasma sanguíneo de un gran número de personas para obtener un promedio constante de componentes proteicos, resulta especialmente difícil garantizar que un receptor no reciba plasma incompatible.

25 Se han desarrollado una serie de enfoques para eliminar selectivamente los anticuerpos del grupo sanguíneo del plasma, incluidos los glóbulos rojos tratados térmicamente y con formalina (Vox Sang., 1967, 12, 75-77), Escherichia coli O<sub>86</sub>:B7 tratada térmicamente que tiene antígenos A y B (Transfusion, 1972, 12, 98-102), polvo de estroma de glóbulos rojos, inmunoabsorbentes derivados de antígeno de estroma de glóbulos rojos (Chemical Soc. Rev., 1978, 7, 423-452) e inmunoabsorbentes de grupos sanguíneos A y B sintéticos (Rev. Transfus. Immunohematol. 1981, 24, 3, 281-287).

30 Los inmunoabsorbentes para cromatografía en fase sólida se han desarrollado como medios de cromatografía comercial 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 inmunoabsorbentes sintéticos es que se construyen sintéticamente en lugar de obtenerse de fuentes naturales y, por lo tanto, tienen propiedades más consistentes de un lote a otro.

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

40 Además, las publicaciones PCT n<sup>o</sup>s WO2015/001277 y WO2013/062479 discuten matrices de cromatografía de afinidad que se unen a anticuerpos anti-A o anti-B.

**Resumen**

45 El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a nuevos medios de cromatografía para la eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B de una muestra (por ejemplo, sangre, hemoderivados, plasma, derivados del plasma o IVIG).

50 Los medios de cromatografía descritos en la presente memoria tienen varias ventajas sobre los medios de cromatografía descritos anteriormente para la eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B, ya que los medios son estables en condiciones ácidas y/o alcalinas durante un período de tiempo prolongado. Además, dichos medios pueden desinfectarse utilizando una disolución que comprende ácido fosfórico, ácido acético y alcohol bencílico, sin perder su capacidad de eliminar anticuerpos anti-A o anti-B.

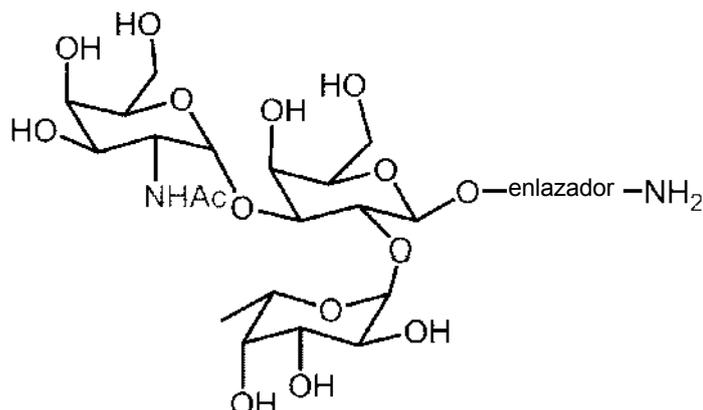
5 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, se proporciona un medio de cromatografía para eliminar anticuerpos anti-A de una muestra, donde el medio de cromatografía comprende un soporte sólido con un ligando antigénico del grupo sanguíneo A unido al mismo, donde el ligando se une al soporte sólido a una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml de soporte sólido, donde el medio de cromatografía es estable en condiciones ácidas y alcalinas. En una realización particular, la carga de ligando es al menos 1 mg/ml de soporte sólido o al menos 1,5 mg/ml de soporte sólido o al menos 1,65 mg/ml de soporte sólido, y donde el medio de cromatografía es estable en condiciones ácidas y alcalinas.

10 En otra realización, se proporciona un medio de cromatografía para eliminar anticuerpos anti-B de una muestra, donde el medio de cromatografía comprende un soporte sólido con un ligando antigénico del grupo sanguíneo B unido al mismo, donde el ligando se une al soporte sólido a una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml de soporte sólido, donde el medio de cromatografía es estable en condiciones ácidas y/o alcalinas. En una realización particular, la carga de ligando es al menos 1,0 mg/ml de soporte sólido o al menos 1,20 mg/ml de soporte sólido, y donde el medio de cromatografía es estable en condiciones ácidas y alcalinas.

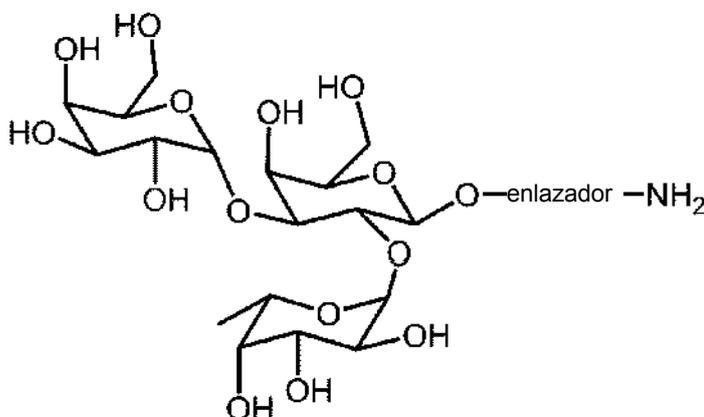
15 En otra realización más, se proporciona un medio de cromatografía para eliminar anticuerpos anti-A y anti-B de una muestra, donde el medio de cromatografía comprende un soporte sólido con ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A y ligandos antigénicos del grupo B unidos a los mismos, cada uno a una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml de soporte sólido.

20 En diversas realizaciones descritas en la presente memoria, el soporte sólido comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poli(éter vinílico), poli(alcohol vinílico), polimetacrilato, poliacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilamida y policarbonato. En una realización particular, el soporte sólido es un soporte sólido basado en poli(éter vinílico). En algunas realizaciones, el soporte sólido está en forma de esferas.

En algunas realizaciones, el ligando antigénico del grupo sanguíneo A comprende la siguiente estructura:



En algunas realizaciones, el ligando antigénico del grupo sanguíneo B comprende la siguiente estructura:



25 En la presente invención, los medios de cromatografía comprenden un ligando antigénico del grupo sanguíneo A y/o un ligando antigénico del grupo sanguíneo B unido a un soporte sólido usando la química de aminación reductora o, los medios de cromatografía comprenden un ligando antigénico del grupo sanguíneo A y/o un ligando antigénico del grupo sanguíneo B unido a un soporte sólido usando la química de tentáculos poliméricos.

30 En la presente invención, el medio de cromatografía se empaqueta en un dispositivo, por ejemplo, una columna de

cromatografía.

Además de los medios de cromatografía, las realizaciones descritas en la presente memoria también se refieren a los métodos para eliminar anticuerpos anti-A y/o anti-B de una muestra (por ejemplo, sangre, hemoderivados, plasma, derivados del plasma o una alimentación de IVIG) utilizando los medios de cromatografía descritos en la presente memoria.

5

En algunas realizaciones, de acuerdo con las reivindicaciones, se proporciona un método para eliminar anticuerpos anti-A o anticuerpos anti-B de una muestra, donde el método comprende las etapas de: proporcionar una muestra que comprende una cantidad conocida inicial de anticuerpos anti-A o anticuerpos anti-B; poner en contacto la muestra con el medio de cromatografía que contiene el ligando antigénico del grupo sanguíneo A si la muestra contiene anticuerpos anti-A o el medio de cromatografía que contiene el ligando antigénico del grupo sanguíneo B si la muestra contiene anticuerpos anti-B, en condiciones adecuadas para que el medio se una a los anticuerpos; recuperar la porción de la muestra que no está unida al medio de cromatografía; y medir la cantidad de anticuerpos anti-A o anticuerpos anti-B en la porción de muestra sin unir al medio de cromatografía, en donde la cantidad de anticuerpos anti-A o anticuerpos anti-B en la porción de la muestra sin unir al medio de cromatografía se reduce en al menos un 50% con respecto a la cantidad conocida inicial de anticuerpos anti-A o anti-B en la muestra.

10

15

Las realizaciones descritas en la presente memoria también se refieren a métodos para eliminar anticuerpos anti-A y anti-B de una muestra que contiene ambos. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria emplean el uso secuencial de los medios de cromatografía descritos en la presente memoria. En otras palabras, una muestra se pone en contacto primero con un ligando antigénico del grupo sanguíneo A que contiene un medio de cromatografía descrito en la presente memoria, seguido de un ligando antigénico del grupo sanguíneo B que contiene un medio de cromatografía descrito en la presente memoria; o alternativamente, la muestra se pone en contacto primero con un ligando antigénico del grupo sanguíneo B que contiene un medio de cromatografía descrito en la presente memoria, seguido de un ligando antigénico del grupo sanguíneo A que contiene un medio descrito en la presente memoria. En otras realizaciones, una muestra se pone en contacto con una mezcla de ambos medios, en donde la mezcla elimina los anticuerpos anti-A y anti-B en una sola etapa. En otras realizaciones más, los métodos descritos en la presente memoria se refieren al uso de un medio de cromatografía que incluye ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A y ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B unidos al mismo soporte sólido a cargas de ligando de al menos 0,8 mg/ml.

20

25

En la presente memoria también se describen métodos para desinfectar una columna de cromatografía que contiene un medio de cromatografía descrito en la presente memoria después de su uso, donde el método comprende poner en contacto la columna con una disolución que comprende ácido fosfórico, ácido acético y alcohol bencílico (PAB) durante al menos tres horas, y donde el medio de cromatografía comprende un ligando antigénico del grupo sanguíneo A y/o un ligando antigénico del grupo sanguíneo B inmovilizado sobre un soporte sólido, y además donde el medio de cromatografía mantiene su capacidad de eliminar anticuerpos anti-A y/o anti-B después de la exposición a PAB.

30

35

Además, las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a métodos de limpieza de una columna de cromatografía que contiene un medio de cromatografía descrito en la presente memoria, utilizando una disolución ácida o alcalina. En algunas realizaciones, se proporciona un método para limpiar una columna de cromatografía que comprende un medio que contiene un ligando antigénico del grupo sanguíneo A y/o un ligando antigénico del grupo sanguíneo B inmovilizado sobre un soporte sólido, donde el método emplea el contacto de la columna de cromatografía que contiene el medio de cromatografía con una disolución ácida o alcalina entre ciclos de purificación, donde el medio de cromatografía mantiene su capacidad de eliminar los anticuerpos anti-A o anti-B, incluso después de una exposición prolongada a una disolución ácida o alcalina (por ejemplo, 50 horas o más). En algunas realizaciones, el medio mantiene su capacidad de eliminar anticuerpos anti-A o anti-B después de 2 ciclos de purificación, o después de 5 ciclos de purificación, o después de 10 ciclos de purificación, o después de 15 ciclos de purificación, o después de 20 ciclos de purificación, o después de 25 ciclos de purificación, o después de 30 ciclos de purificación, o después de 35 ciclos de purificación, o después de 40 ciclos de purificación, o después de 45 ciclos de purificación, o después de 50 ciclos de purificación o más de 50 ciclos de purificación, o incluso más de 100 ciclos de purificación, donde la columna de cromatografía se limpia utilizando una disolución ácida o alcalina entre los ciclos de purificación, y un ciclo típico puede consistir en 30 minutos de exposición al agente de limpieza.

40

45

50

Los medios descritos en la presente memoria también se pueden usar para la purificación de anticuerpos monoclonales IgM anti-A o anticuerpos monoclonales anti-B de una alimentación clarificada de cultivo celular.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para purificar un anticuerpo monoclonal IgM anti-A de una alimentación clarificada de cultivo celular, donde el método comprende las etapas de: (a) proporcionar una alimentación clarificada de cultivo celular que contiene un anticuerpo monoclonal IgM anti-A; (b) incubar la alimentación con el medio que tiene un ligando antigénico del grupo sanguíneo A unido a un soporte sólido a una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml, para facilitar la unión del anticuerpo IgM anti-A al medio; (c) lavar el medio con un tampón acuoso que tiene un pH que varía de 3,5 a 9,0; (d) eluir el anticuerpo IgM anti-A del medio usando un tampón que tiene un pH que varía de 2,0 a 3,0, para obtener un eluato; y (e) recuperar el anticuerpo IgM anti-A purificado en el eluato.

55

En otras realizaciones, se proporciona un método para purificar un anticuerpo monoclonal IgM anti-B de una alimentación clarificada de cultivo celular, donde el método comprende las etapas de: (a) proporcionar una alimentación clarificada de cultivo celular que contiene un anticuerpo monoclonal IgM anti-B; (b) incubar la alimentación con el medio que tiene un ligando antigénico del grupo sanguíneo B unido a un soporte sólido a una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml, para facilitar la unión del anticuerpo IgM anti-B al medio; (c) lavar el medio con un tampón acuoso que tiene un pH que varía de 3,5 a 9,0; (d) eluir el anticuerpo IgM anti-B del medio usando un tampón que tiene un pH que varía de 2,0 a 3,0, para obtener un eluato; y (e) recuperar el anticuerpo IgM anti-B purificado en el eluato.

En algunas realizaciones, el medio se empaqueta en una columna de cromatografía, y se hace fluir una alimentación clarificada de cultivo celular que contiene un anticuerpo monoclonal IgM anti-A o un anticuerpo IgM anti-B a través de la columna.

### Breve descripción de los dibujos

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

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

### Descripción detallada

Recientemente ha habido un interés creciente en la aplicación de medios de cromatografía inmunoabsorbentes sintéticos para la eliminación de anticuerpos IgG anti-A y anti-B de la inmunoglobulina intravenosa (IGIV), que consiste en anticuerpos IgG polivalentes concentrados extraídos de plasma mezclado obtenido de varios donantes de sangre, a veces hasta mil o más de mil donantes de sangre. Sin embargo, la mayoría de los medios de cromatografía disponibles comercialmente están limitados por las condiciones operativas en las que se pueden usar.

Las realizaciones descritas en la presente memoria se refieren a nuevos medios de cromatografía para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B de una muestra.

Los medios de cromatografía descritos en la presente memoria tienen varias ventajas sobre los medios de cromatografía descritos anteriormente. Por ejemplo, los medios de cromatografía son útiles para operaciones a gran escala, donde los medios pueden eluirse y limpiarse fácilmente *in situ* varias veces en un amplio rango de condiciones de pH, sin perder su capacidad de eliminar los anticuerpos anti-A o anti-B de una muestra (p. ej., sangre, hemoderivados, plasma, derivados del plasma o alimentación de IVIG).

Además, las condiciones de carga utilizadas con los medios de cromatografía descritos en la presente memoria pueden abarcar un rango de pH de 3,5 a 9, y las condiciones de elución pueden abarcar un pH que varía de 2 a 4. Debido a que los medios de cromatografía descritos en la presente memoria se pueden usar, limpiar *in situ* y desinfectar en un amplio rango de condiciones de pH, brindan al operador una gran flexibilidad en las condiciones de operación a usar con los medios.

Los medios de cromatografía descritos en la presente memoria pueden desinfectarse utilizando un tampón de ácido fosfórico-ácido acético-alcohol bencílico (PAB), que no se ha descrito previamente para limpiar *in situ* un medio útil para eliminar los anticuerpos anti-A y anti-B. Como se demuestra mediante los Ejemplos de la presente memoria, se descubrió que los medios de cromatografía descritos en la presente memoria mantienen su rendimiento incluso después de 150 horas de exposición a PAB.

La presente invención se basa, al menos, en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que un medio de cromatografía útil para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B de una muestra se puede limpiar con disoluciones tanto ácidas como alcalinas.

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 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 medio empaquetado en una columna que luego se utiliza en condiciones adecuadas. La capacidad de unión de cualquier medio depende en gran medida de las condiciones subyacentes. En general, cuanto menor sea el caudal de muestra, mayor será la capacidad de unión. A medida que el caudal se acerca a cero, la capacidad de unión se acerca a la capacidad máxima disponible. La capacidad de unión de un medio de cromatografía descrito en la presente memoria se basa en la cantidad de anticuerpos anti-A o anti-B que el medio de cromatografía puede unir por volumen de medio a un caudal establecido.

Sin una limpieza y desinfección adecuadas, la capacidad de unión de un medio de cromatografía, incluido un medio de cromatografía de afinidad, generalmente cae por debajo del valor inicial. Además, los medios de cromatografía generalmente tienden a perder capacidad de unión después de la exposición a disoluciones ácidas o alcalinas. Cuando la capacidad de unión es inferior a un valor deseado, una cantidad significativa de la molécula destinada a unirse al

medio puede "abrirse paso" o co-eluirse con la fracción de elución, lo cual es en gran medida indeseable. Las realizaciones descritas en la presente memoria proporcionan medios de cromatografía de afinidad para eliminar anticuerpos anti-A y/o anti-B de una muestra (p. ej., sangre, hemoderivados, plasma, derivados del plasma y alimentación de IVIG), que mantienen su capacidad de unión incluso después de limpiar en condiciones ácidas o alcalinas o tras una desinfección utilizando PAB.

El término "capacidad de unión estática" se define como la masa de proteína adsorbida (por ejemplo, anticuerpos anti-A y/o anti-B en este caso) por un medio de cromatografía (por ejemplo, el medio de cromatografía de afinidad descrito en la presente memoria) dividido por el volumen del medio de cromatografía utilizado. Un método ejemplar 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 disolución de proteína de concentración conocida, se permite que la disolución se incube con el medio de cromatografía para facilitar la unión de la proteína (por ejemplo, anticuerpos anti-A y/o anti-B en este caso) al medio de cromatografía. El tiempo de incubación puede variar (por ejemplo, de 5 minutos a 72 horas) y lo puede determinar fácilmente un experto en la técnica, por ejemplo, midiendo la concentración de la proteína en el sobrenadante periódicamente (por ejemplo, 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 disolución, la concentración de la disolución de proteína se mide una vez más en el sobrenadante. La capacidad de unión estática se mide luego mediante la cantidad de proteína de partida (antes de la incubación) menos la cantidad de proteína en el sobrenadante (después de la incubación) dividida por el volumen del medio de cromatografía utilizado.

La capacidad de unión estática de un medio de cromatografía particular generalmente está influenciada por la composición de la disolución de proteína, que incluye uno o más de los siguientes factores, por ejemplo, la concentración de la proteína, la cantidad de medio cromatográfico utilizado, la concentración de otros componentes en la disolución (sales, moléculas orgánicas, tampones), el pH de la disolución y la conductividad. También puede estar influenciada por la temperatura de la disolución 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 puede denominarse "capacidad de unión de saturación" o "capacidad de unión máxima".

El sobrenadante de una muestra en contacto con un medio de cromatografía puede obtenerse permitiendo que el medio de cromatografía en una suspensión se asiente en el fondo de un recipiente o una columna. El proceso de asentamiento puede acelerarse sometiendo la suspensión del medio de cromatografía a centrifugación o mediante vibración. La disolución de sobrenadante se puede separar luego del medio de cromatografía transfiriéndola a través de una pipeta, jeringa o bomba a un recipiente distinto. En algunas realizaciones, el sobrenadante se obtiene filtrando una suspensión de un medio de cromatografía a través de una membrana o un material poroso, después de la incubación con una muestra.

El término "capacidad de unión dinámica" se define como la cantidad de una proteína (por ejemplo, anticuerpos anti-A y/o anti-B en este caso) que se une a una columna de cromatografía que contiene un medio de cromatografía descrito en la presente memoria en condiciones de flujo en el punto en que la concentración de la disolución 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 el 10% de la concentración inicial. Esta masa de proteína se divide luego por el volumen del medio de cromatografía en la columna del cromatógrafo.

La capacidad de unión dinámica de un medio de cromatografía generalmente está influenciada por la composición de la disolución de proteína utilizada, que incluye uno o más de los siguientes factores, por ejemplo, la concentración de la proteína, la concentración de otros componentes en la disolución (sales, moléculas orgánicas, tampones), el pH de la disolución, y la conductividad. La capacidad de unión dinámica también puede verse influida por la temperatura a la que se carga la columna y por el caudal al que se carga la disolución de proteína en la columna. La disminución del caudal de la disolución de proteína en la columna de cromatografía aumenta la capacidad de unión dinámica que se mide. A la inversa, aumentar el caudal de la disolución 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 "muestra" se define como la disolución que contiene al menos una proteína de interés (por ejemplo, anticuerpos anti-A y/o anti-B en este caso) destinada a unirse a un medio de cromatografía descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, la proteína de interés es un anticuerpo o una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la inmunoglobulina es un anticuerpo hacia el antígeno del grupo sanguíneo A (es decir, anticuerpo anti-A). En otras realizaciones, la inmunoglobulina es un anticuerpo hacia el antígeno del grupo sanguíneo B (es decir, anticuerpo anti-B). Los ejemplos de muestras incluyen, entre otros, sangre, plasma, derivados del plasma, productos derivados de la sangre, alimentación de inmunoglobulinas intravenosas (IVIG o alimentación de IVIG).

Los términos "eliminar", "eliminación" o "eliminado", como se usan en la presente memoria, se refieren a una reducción sustancial de la cantidad de anticuerpos anti-A o anti-B presentes en una muestra, después de poner en contacto la

muestra con un medio de cromatografía descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, la cantidad de anticuerpos anti-A o anti-B se reduce en al menos un 50%, o al menos un 70%, o al menos un 80%, o al menos un 90%, o al menos un 95%, o más de un 95% en comparación con la cantidad inicial. La cantidad de anticuerpos anti-A y/o anti-B antes y después del contacto con un medio de cromatografía descrito en la presente memoria puede medirse utilizando uno o más métodos conocidos en la técnica y los descritos en la presente memoria. Por ejemplo, las cantidades de anticuerpos anti-A o anti-B en una muestra antes y después de la incubación con un medio de cromatografía descrito en la presente memoria se pueden medir utilizando ensayos de aglutinación, por ejemplo, prueba de Coombs directa (DCT) y prueba de Coombs indirecta (ICT) como se describe en la farmacopea europea (2.6.20). Sin embargo, tanto la DCT como la ICT tienen una gran variabilidad y son difíciles de estandarizar (Thorpe SJ et al., Vox Sanguinis 2009, 97, 160-168).

Como se describe en la presente memoria, la citometría de flujo se usa para medir la cantidad de anticuerpos anti-A o anti-B eliminados de una muestra (por ejemplo, una alimentación de IVIG) después de la purificación con un medio de cromatografía descrito en la presente memoria. El método de citometría de flujo que utiliza glóbulos rojos para capturar anticuerpos de tipo sanguíneo está bien documentado en la bibliografía (Christensson et al., Transfusion 1996; 36: 50-505, Dhainaut et al., 2013; 104: 115-126). Como se describe en la presente memoria, las muestras de IVIG se incuban con glóbulos rojos de tipo A o tipo B durante un tiempo determinado, se lavan exhaustivamente y se tiñen con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia (F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG humana de cabra H+L, Jackson ImmunoResearch). Las muestras se diluyen a una concentración óptima para la medición mediante citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (IFM) de las muestras se evalúa mediante un citómetro de flujo (Guava 5HT, EMD Millipore). La IFM neta se usa para comparar el anticuerpo anti-A o anti-B en una muestra (por ejemplo, una alimentación de IVIG) antes y después del contacto con un medio de cromatografía que contiene un ligando antigénico del grupo sanguíneo A o un ligando antigénico del grupo B descrito en la presente memoria, y también con y sin exposición a condiciones ácidas o alcalinas. El porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B se calcula comparando el nivel de anticuerpos anti-A o anti-B en el flujo (o sobrenadante) con el nivel de anticuerpos anti-A o anti-B en la muestra

El término "estabilidad en condiciones ácidas" se define como la capacidad de un medio cromatográfico de eliminar un porcentaje sustancial de una impureza (por ejemplo, más del 50% o más del 60% o más del 70% o más del 80% o más del 90% o una eliminación más alta de anticuerpos anti-A y/o anti-B) de una muestra incluso después de una exposición de 50 horas a una disolución que tiene un pH bajo, típicamente por debajo de pH 4. Los medios cromatográficos que son estables en condiciones ácidas se pueden eluir, limpiar y/o desinfectar en condiciones ácidas. Aquellos medios cromatográficos que no son estables en condiciones ácidas generalmente muestran una capacidad reducida de eliminar un porcentaje sustancial de impurezas (es decir, anticuerpos anti-A y/o anti-B en este caso) después de la exposición a condiciones ácidas.

Los medios de cromatografía se eluyen y se limpian comúnmente usando disoluciones ácidas. Por ejemplo, los agentes limpiadores de uso común son ácido fosfórico 0,15 M o 0,3% v/v de ácido clorhídrico. Las disoluciones de elución ejemplares incluyen, por ejemplo, glicina 0,1 M, pH 2,0; Glicina 0,1 M, pH 2,2; Glicina 0,1 M, pH 2,5; Glicina 0,1 M, pH 2,7; y glicina 0,1 M, pH 3,0. Sin embargo, muchos medios disponibles comercialmente tienden a perder su capacidad de eliminar las impurezas de una muestra después de la exposición a tales condiciones. Los medios de cromatografía descritos en la presente memoria mantienen su capacidad de eliminar anticuerpos anti-A y anti-B de una muestra incluso después de una exposición prolongada (es decir, incluso después de 50 horas o más) a condiciones ácidas, es decir, son estables en condiciones ácidas. La estabilidad en condiciones ácidas de los medios de cromatografía descritos en la presente memoria puede evaluarse exponiendo los medios a una disolución ácida durante un período específico de tiempo, y luego evaluando su rendimiento respecto de un control que no se ha expuesto a la disolución ácida. La evaluación del rendimiento de los medios puede incluir mediciones de la capacidad de unión, la resolución de especies deseadas y no deseadas, la eliminación de impurezas o combinaciones de las mismas.

El término "estabilidad en condiciones alcalinas" se define como la capacidad de los medios cromatográficos de mantener su capacidad de eliminar un porcentaje sustancial de una impureza (por ejemplo, más del 50% o más del 60% o más del 70% o más del 80% o una eliminación mayor de un 90% o más de anticuerpos anti-A y/o anti-B de una muestra, incluso después de una exposición de 50 horas a una disolución que tiene un pH alto, típicamente por encima de pH 9. Los medios cromatográficos que tienen estabilidad en condiciones alcalinas se pueden eluir, limpiar y/o desinfectar en condiciones básicas. Los medios cromatográficos que no tienen estabilidad en condiciones alcalinas generalmente muestran una capacidad reducida de eliminar un porcentaje sustancial de impurezas (es decir, anticuerpos anti-A y/o anti-B en este caso) después de una exposición prolongada a condiciones alcalinas.

Los medios de cromatografía se desinfectan comúnmente utilizando disoluciones alcalinas (por ejemplo, hidróxido de sodio 0,1 M o 0,5 M). Sin embargo, la mayoría de los medios de cromatografía disponibles comercialmente tienden a perder su capacidad de eliminar las impurezas de una muestra después de la exposición a tales condiciones. Los medios de cromatografía descritos en la presente memoria mantienen su capacidad de eliminar los anticuerpos anti-A y anti-B de una muestra o la capacidad de eliminar una cantidad sustancial de anticuerpos anti-A o anti-B (por ejemplo, al menos el 50% o al menos el 60% o al menos el 70% o al menos el 80% o más de una muestra, incluso después de una exposición prolongada (por ejemplo, aproximadamente 50 horas o más) a condiciones alcalinas, es decir, tienen estabilidad en condiciones alcalinas. La estabilidad en condiciones alcalinas de los medios puede

5 evaluarse exponiendo los medios a una disolución alcalina durante un período de tiempo específico y luego evaluando su rendimiento (por ejemplo, la capacidad de unión o la capacidad de eliminar una cantidad sustancial de anticuerpos anti-A o anti-B) respecto de un control que no se ha expuesto a una disolución alcalina. La evaluación del rendimiento de los medios puede incluir mediciones de la capacidad de unión, la resolución de especies deseadas y no deseadas, la eliminación de impurezas o combinaciones de las mismas.

10 En algunas realizaciones, la estabilidad en condiciones alcalinas o ácidas se refiere a la capacidad de un medio de cromatografía descrito en la presente memoria de retener al menos el 65%, o al menos el 70%, o al menos el 75%, o al menos el 80%, o al menos el 85%, o al menos el 90%, o al menos el 95% de su capacidad de unión inicial después de 5 horas, o después de 10 horas, o después de 15 horas, o después de 20 horas, o después de 25 horas, o después de 30 horas, o después de 40 horas, o después de 50 horas, o después de 60 horas, o después de 70 horas, o después de 80 horas, o después de 90 horas, o después de 100 horas de exposición a una disolución alcalina o ácida, respectivamente. En otra realización, la estabilidad en condiciones alcalinas o ácidas se refiere a una disminución de la capacidad de unión inicial del ligando en menos del 70%, o menos del 60%, o menos del 50%, o menos del 40%, o menos del 30%, después de una exposición de 5 horas o 10 horas o 15 horas o 20 horas o 25 horas o 30 horas o 40 horas o 50 horas o 60 horas o 70 horas o 80 horas o 90 horas o 100 horas o más, a una disolución alcalina o ácida, respectivamente.

El término "capacidad de unión inicial", como se usa en la presente memoria, se refiere a la cantidad de anticuerpos anti-A o anti-B que puede capturarse mediante una unidad de volumen de un medio de cromatografía descrito en la presente memoria, antes de la exposición del medio a condiciones ácidas o alcalinas.

20 En algunas realizaciones, los medios de cromatografía descritos en la presente memoria pueden resistir la limpieza y/o desinfección ácida o alcalina durante un período prolongado de tiempo, lo que hace que los medios de cromatografía sean candidatos atractivos, especialmente para la eliminación rentable de anticuerpos anti-A y/o anti-B de una muestra (p. ej., sangre, hemoderivados, plasma, derivados del plasma o una alimentación de IVIG).

25 El término "carga de ligando", como se usa en la presente memoria, se refiere a la cantidad de ligando utilizada por unidad de volumen del soporte sólido durante la reacción de acoplamiento para inmovilizar el ligando sobre el soporte sólido. La carga de ligando se mide en mg/ml o g/litro del volumen sedimentado de soporte sólido. En algunas realizaciones, la carga de ligando es al menos 0,8 mg/ml o al menos 1 mg/ml o al menos 1,1 mg/ml o al menos 1,2 mg/ml o al menos 1,5 mg/ml o 1,65 mg/ml o mayor. En una realización particular, la carga de ligando es de al menos 1,65 mg/ml, en el caso de un ligando antigénico del grupo sanguíneo A o de al menos 1,2 mg/ml, en el caso de un ligando antigénico del grupo sanguíneo B. El volumen establecido de soporte sólido se puede determinar permitiendo que el soporte sólido se asiente por gravedad en una suspensión que contiene el tampón de almacenamiento o agua durante un número fijo de horas.

35 El término "medio" o "medio de cromatografía", como se usa 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 él, a una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml de soporte sólido. En algunas realizaciones, se utiliza un enlazador para la inmovilización, que puede ser parte del propio ligando o una entidad distinta.

40 El término "enlazador" se define como una especie que conecta químicamente un ligando antigénico de oligosacárido del grupo sanguíneo al grupo funcional que se utiliza para la inmovilización en un soporte sólido. Los ejemplos no limitantes de tales enlazadores incluyen  $(\text{CH}_2)_n$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{-O-(CH}_2)_n$ ,  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{-CONH}$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{-NR-(CH}_2)_n$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{-NH-CO-NH-(CH}_2)_n$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{-NH-(CH}_2)_n$ , and  $(\text{CH}_2)_m\text{-CONH-(CH}_2)_n$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{-COS}$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{-S-(CH}_2)_n$ ,  $(\text{CH}_2)_m\text{-S-CO-S-(CH}_2)_n$ , y  $(\text{CH}_2)_m\text{-COS-(CH}_2)_n$  donde m y n pueden variar en 1-22.

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

50 El término "cromatografía de afinidad", como se usa en la presente memoria, se refiere a un modo de cromatografía en el que una molécula a separar o eliminar (por ejemplo, anticuerpos anti-A y/o anti-B) se aísla por su interacción con otra molécula (por ejemplo, un ligando antigénico del grupo sanguíneo A o un ligando antigénico del grupo sanguíneo B inmovilizado sobre un soporte sólido) que interactúa específicamente con la molécula a separar o eliminar.

55 El término "IgG", "inmunoglobulina", "Ig" o "anticuerpo" (utilizado indistintamente en la presente memoria) se refiere a una proteína que tiene una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas que consta de dos cadenas pesadas y dos ligeras, y dichas cadenas se estabilizan, por ejemplo, por enlaces disulfuro entre cadenas, que tiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. El término "inmunoglobulina de cadena única" o "anticuerpo de cadena única" (utilizado indistintamente en la presente memoria) se refiere a una proteína que tiene una estructura de dos cadenas polipeptídicas que consiste en una cadena pesada y una cadena ligera, y dichas cadenas se estabilizan, por ejemplo, mediante enlazadores 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 comprende 3 a 4 bucles peptídicos) estabilizados, por ejemplo, mediante una lámina  $\beta$  plegada y/o un enlace disulfuro intracatenario. Los dominios se mencionan además en la presente memoria como "constantes" o "variables", 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 la cadena ligera", "dominios constantes de la cadena ligera", regiones "CL" o dominios "CL". Los dominios "constantes" de las cadenas pesadas de anticuerpos se denominan indistintamente "regiones constantes de la cadena pesada", "dominios constantes de la cadena pesada", regiones "CH" o dominios "CH". 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 la cadena pesada", "dominios variables de la cadena pesada", regiones "VH" o dominios "VH".

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

El término "IgM" o "Inmunoglobulina M" se refiere a los anticuerpos con una estructura pentamérica, por ejemplo, los anticuerpos IgM que se encuentran en el suero sanguíneo. Con un peso molecular de aproximadamente 970 kDa, los anticuerpos IgM son considerablemente más grandes que los IgG que tienen una estructura monomérica y un peso molecular de aproximadamente 150 kDa. A diferencia de los anticuerpos IgG que tienen 2 sitios de unión al antígeno, los anticuerpos IgM tienen 10 sitios de unión al antígeno. Los anticuerpos IgM son los principales responsables de la aglutinación de los glóbulos rojos cuando un receptor recibe una transfusión de sangre de un donante incompatible. Por ejemplo, una persona con un grupo sanguíneo A y que tiene anticuerpos IgM anti-B experimentará aglutinación tras la transfusión de un donante del grupo sanguíneo B. Los anticuerpos IgM grandes generalmente se pueden separar de los anticuerpos IgG más pequeños del plasma sanguíneo por fraccionamiento.

Además de eliminar los anticuerpos anti-A y/o anti-B de una muestra, las composiciones descritas en la presente memoria también se pueden usar para obtener un anticuerpo IgM anti-A purificado o un anticuerpo anti-B purificado.

En algunas realizaciones, el anticuerpo IgM anti-A o el anticuerpo IgM anti-B se aísla de un cultivo celular clarificado que expresa tal anticuerpo, utilizando medios de ligando antigénico del grupo sanguíneo A o medios de ligando antigénico del grupo sanguíneo B descritos en la presente memoria, respectivamente. Un proceso ejemplar para purificar los anticuerpos IgM es el siguiente. Un cultivo celular clarificado que expresa un anticuerpo IgM en PBS 10 mM se hace fluir sobre una columna que contiene el medio de ligando antigénico del grupo sanguíneo A o el medio de ligando antigénico del grupo sanguíneo B. La columna se lava posteriormente con un tampón acuoso que varía a un pH que oscila entre 3,0 y 9,0. El anticuerpo IgM anti-A o el anticuerpo anti-B unido a la columna se eluye de la columna con un tampón ácido que varía en un pH de 2,0 a 3,0.

Los medios descritos en la presente memoria se pueden usar para obtener un anticuerpo IgM anti-A o IgM anti-B con una pureza de al menos el 80%, o al menos el 90%, o al menos el 95% o más del 95%, según lo determinado mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño. En algunas realizaciones, la pureza del anticuerpo IgM es al menos del 95%, según se determina mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño.

En algunas realizaciones, el anticuerpo IgM anti-A o el anticuerpo IgM anti-B purificado se usa como una molécula modelo 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, como se describe en la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. N° 62/215,423, presentada el 8 de septiembre de 2015.

El término "purificar" o "purificación" o "purificado" o "pureza", como se usa en la presente memoria, se refiere a aumentar la concentración de una molécula de interés en una muestra que comprende la molécula de interés y una o más impurezas. Por lo general, el grado de pureza de la molécula de interés aumenta al eliminar (total o parcialmente) al menos una impureza de la muestra. En algunas realizaciones, la pureza de una molécula de interés (por ejemplo, el anticuerpo IgM en este caso) se mide en "partes por millón" o "ppm". En algunas realizaciones, las unidades ppm se refieren a la cantidad de impurezas (p. ej., proteínas de células huésped (HCP) en nanogramos/miligramo por molécula de interés (p. ej., IgM monoclonal) en miligramos/mililitro, donde la molécula de interés y las HCP están en disolución. En algunas realizaciones, la pureza de un anticuerpo monoclonal IgM-A o IgM-B se incrementa hasta al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 96%, o al menos el 97%, o al menos el 98%, o al menos el 99% o más, usando las composiciones descritas en la presente memoria.

El término "clarificar" o "clarificación" o "clarificado", como se usa en la presente memoria, se refiere a un proceso para eliminar partículas suspendidas y/o coloides en una alimentación de cultivo celular, reduciendo así la turbidez, de una disolución que contiene una molécula de interés (por ejemplo, una alimentación de cultivo celular que contienen un anticuerpo IgM), como se mide típicamente en UTN (unidades de turbidez nefelométrica). La clarificación se puede lograr mediante una variedad de medios, incluida la centrifugación o filtración. La centrifugación se puede hacer en modo discontinuo o continuo, mientras que la filtración se puede hacer en un flujo normal (por ejemplo, filtración en

profundidad) o en un modo de flujo tangencial. En los procesos utilizados en la industria actual, la centrifugación suele ir seguida por filtros de profundidad destinados a eliminar las impurezas insolubles, que pueden no haberse eliminado por centrifugación. Además, se pueden usar métodos para mejorar la eficiencia de la clarificación, por ejemplo, la precipitación. La precipitación de impurezas se puede realizar por diversos medios, tales como la floculación, el ajuste del pH (precipitación ácida), los cambios de temperatura, el cambio de fase debido a polímeros o moléculas pequeñas sensibles a estímulos, o cualquier combinación de estos métodos. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, la clarificación implica uno o más de centrifugación, filtración, filtración de profundidad y precipitación.

El término "pH de carga" se refiere al pH de una muestra que contiene anticuerpos anti-A y/o anti-B que se incuban con un medio de cromatografía descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, el pH de una muestra incubada con un medio de cromatografía descrito en la presente memoria varía de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 9,0 para un medio adecuado para la eliminación de anticuerpos anti-A, y de aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente 9,0 para un medio adecuado para la eliminación de anticuerpos anti-B. Se espera que, en estas condiciones, la cantidad de anticuerpos anti-A o anti-B en una muestra se reduzca en al menos un 50% con respecto a antes de poner en contacto la muestra con el medio.

Como se usa en la presente memoria, el término "limpieza" se refiere a una etapa durante un proceso de cromatografía, que implica eliminar los niveles de trazas de impurezas que quedan en una columna de cromatografía de afinidad después del uso, por ejemplo, una columna que contiene el medio de cromatografía descrito en la presente memoria para eliminar los anticuerpos anti-A y/o anti-B, con el fin de conservar el rendimiento y la integridad de la columna y el medio contenido en ella. Si bien la etapa de limpieza elimina las impurezas de la columna, idealmente debería tener un impacto mínimo en el rendimiento de la columna, medido utilizando la capacidad de unión del medio de cromatografía. La mayoría de los medios de cromatografía disponibles comercialmente se limpian utilizando una disolución ácida o una disolución alcalina. Sin embargo, la mayoría de los medios de cromatografía disponibles comercialmente son inestables en condiciones extremas de pH y, por lo tanto, no se pueden limpiar con condiciones tanto ácidas como alcalinas. Los medios de cromatografía descritos en la presente memoria pueden limpiarse utilizando disoluciones tanto ácidas como alcalinas. Los ejemplos de disoluciones de limpieza incluyen disoluciones ácidas tales como ácido fosfórico 0,15 M o ácido clorhídrico al 0,3% v/v.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "limpieza *in situ*" o "CIP" es un método para limpiar las superficies interiores de tuberías, recipientes, equipos de proceso, filtros y accesorios asociados, sin desmontarlos. El beneficio de usar CIP es que la limpieza es más rápida, requiere menos mano de obra y es más repetible, y representa un riesgo menor de exposición química para las personas. Para una columna de cromatografía, CIP se refiere a la limpieza del medio de cromatografía, así como el cuerpo de la columna y los accesorios de los extremos sin desempaquetar la columna. Por lo general, una columna de cromatografía que se limpia después de su utilización se vuelve a equilibrar inmediatamente para la siguiente utilización.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "campaña" se refiere a varias rondas de procesos de purificación individuales, que se ejecutan una tras otra para procesar una cantidad deseada de muestra. En el caso de la eliminación de anticuerpos anti-A y/o anti-B de una muestra, una campaña generalmente implica el uso de una etapa de cromatografía de afinidad para eliminar los anticuerpos anti-A y/o anti-B junto con una o más etapas posteriores, que se puede usar para llegar a una composición terapéutica, por ejemplo, para inyectarla en un paciente, o para llegar a una composición que tenga ciertos componentes deseables. Tales etapas posteriores pueden variar de un usuario final a otro, según el propósito de la campaña. Aunque la limpieza se practica habitualmente entre utilizaciones dentro de la campaña, cuando se completa una campaña, las columnas de cromatografía se desinfectan aún más para su almacenamiento, ya que las columnas se utilizan nuevamente en la próxima campaña, que podría ser varios días o semanas o meses después.

El término "elución" se refiere a una etapa durante un proceso de purificación, en el que un medio de cromatografía descrito en la presente memoria se pone en contacto con un tampón de elución para eliminar las impurezas (es decir, anti-A y/o anti-B) unidas al medio. Los ejemplos de tampones de elución incluyen glicina 0,1 M, pH 2,0; Glicina 0,1 M, pH 2,2; Glicina 0,1 M, pH 2,5; Glicina 0,1 M, pH 2,7; Glicina 0,1 M, pH 3,0.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "desinfección" o "desinfectar" es la etapa que se utiliza después de completar una campaña, y está diseñada para reducir la población microbiana a un nivel considerado seguro o aceptable, según lo determine la FDA u otras agencias reguladoras. La desinfección se logra típicamente utilizando calor o productos químicos. Una columna de cromatografía que debe almacenarse hasta la próxima campaña generalmente se desinfecta por medios químicos debido a la impracticabilidad de la desinfección por calor. La mayoría de las columnas de cromatografía de afinidad se desinfectan utilizando NaOH hasta 0,5 M. Sin embargo, también se sabe que el NaOH 0,5 M disminuye el rendimiento de los medios de cromatografía. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, se usa una disolución que comprende ácido fosfórico, ácido acético y alcohol bencílico (PAB) para la desinfección. Sorprendentemente, los medios de cromatografía descritos en la presente memoria mantienen su capacidad de unión o la capacidad de eliminar una cantidad sustancial de anticuerpos anti-A y/o anti-B incluso después de la desinfección con PAB.

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 dichos anticuerpos en muestras derivadas de sangre (por ejemplo, sangre, hemoderivados, plasma, derivados del plasma o una alimentación de IVIG).

5 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 B o un grupo sanguíneo AB. Por consiguiente, es deseable eliminar dichos anticuerpos en muestras derivadas de sangre (por ejemplo, sangre, hemoderivados, plasma, derivados del plasma o una alimentación de IVIG).

## II. Ligandos ejemplares

Las composiciones descritas en la presente memoria son útiles para eliminar anticuerpos anti-A o anti-B de una muestra, por ejemplo, sangre, hemoderivados, plasma, derivados del plasma o alimentación de IVIG.

10 Las composiciones descritas en la presente memoria incluyen ligandos basados en oligosacáridos unidos a un soporte sólido adecuado.

15 Los ligandos basados en oligosacáridos ejemplares 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 = el enlace del ligando al soporte sólido, aunque también se pueden usar enlaces en otras posiciones de la estructura del ligando.

20 Los ejemplos de ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A incluyen, pero sin limitación, moléculas que tienen las siguientes estructuras: antígeno de trisacárido A (GalNAc $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ -R), antígeno de tetrasacárido A Tipo 1 (GalNAc $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R), antígeno de tetrasacárido A Tipo 2 (GalNAc $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R), antígeno de tetrasacárido A Tipo 3 (GalNAc $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R), y antígeno de tetrasacárido A Tipo 4 (GalNAc $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R). En una realización particular, el ligando es un antígeno de trisacárido A (GalNAc $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ -R), que está unido a un soporte sólido.

25 Los ejemplos de ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B incluyen moléculas que tienen las siguientes estructuras: antígeno de trisacárido B (Gal $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ -R), antígeno de tetrasacárido B Tipo 1 (Gal $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R), antígeno de tetrasacárido B Tipo 2 (Gal $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R), antígeno de tetrasacárido B Tipo 3 (Gal $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\alpha$ 1-R), y antígeno de tetrasacárido B Tipo 4 (Gal $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R). En una realización particular, el ligando es un antígeno de trisacárido B (Gal $\alpha$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,2]Gal $\beta$ -R) unido a un soporte sólido.

## III. Soportes sólidos ejemplares

30 Uno o más de los ligandos mencionados anteriormente pueden unirse a un soporte sólido a una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml de soporte sólido, dando como resultado un medio de cromatografía que es adecuado para eliminar los anticuerpos hacia los antígenos del grupo sanguíneo A y/o del grupo sanguíneo B.

35 Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, alúmina, sílice, celita, cerámica, óxidos metálicos, vidrio poroso, vidrio de poro controlado, polímeros de carbohidratos, polisacáridos, agarosa, sefarosa, sefadex, dextrano, celulosa, almidón, quitina, zeolitas, polímeros sintéticos, poli(éter vinílico), polietileno, polipropileno, poliestireno, nailon, poliacrilatos, polimetacrilatos, poli(acrilamidas), poli(anhídrido maleico), membranas, fibras huecas y fibras. En algunas realizaciones, el soporte sólido es un soporte sólido polimérico poroso o no poroso, y comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en poli(éter vinílico), poli(alcohol vinílico), polimetacrilato, poli(acrilato), poliestireno, poli(acrilamida), polimetacrilamida y policarbonato. En una realización particular, el soporte sólido es un soporte sólido basado en poli(éter vinílico). En algunas realizaciones, el soporte sólido está en forma de esferas (por ejemplo, una esfera porosa basada en poli(éter vinílico)).

## IV. Métodos para unir ligandos a soportes sólidos

45 Es posible emplear una gran cantidad de grupos funcionales para facilitar la unión 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 particular, se usa un grupo amina como grupo funcional.

El soporte sólido también puede modificarse y/o activarse para incluir uno o más grupos funcionales mencionados anteriormente que facilitan la inmovilización de un ligando o ligandos adecuados al soporte.

En una realización particular, el soporte sólido se modifica utilizando la química de aminación reductora, en donde el soporte sólido se derivatiza para ofrecer un grupo aldehído para la inmovilización de ligandos.

50 Dicha derivatización se logra modificando primero el soporte sólido (por ejemplo, una esfera basada en poli(éter vinílico)) para incluir grupos epóxido, que se hidroliza adicionalmente para producir un grupo diol. El grupo diol se reduce posteriormente a un grupo aldehído. El soporte sólido que contiene aldehído (por ejemplo, un soporte sólido a una densidad de aldehído de aproximadamente o más de 1  $\mu$ mol/ml de soporte sólido) se somete luego a la etapa de inmovilización a una carga de ligando deseada (por ejemplo, al menos 0,8 mg/ml) a través de una reacción de

aminación reductora entre los grupos aldehído y amina.

En una realización particular, el soporte sólido se modifica utilizando la química de tentáculos poliméricos, en la que el soporte sólido se derivatiza para incluir un grupo ácido carboxílico para la etapa de inmovilización de ligandos. Dicha derivatización se logra primero polimerizando un monómero adecuado (por ejemplo, ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido itacónico, acrilato de terc-butilo, metacrilato de terc-butilo) de la superficie del soporte sólido (por ejemplo, una esfera basada en poli(éter vinílico)) usando un método de polimerización iniciada con cerio. El soporte sólido que contiene ácido carboxílico (por ejemplo, un soporte sólido a una densidad carboxílica de aproximadamente o más de 1  $\mu\text{mol/ml}$  de soporte sólido) se somete luego a la etapa de inmovilización a una carga de ligando deseada (por ejemplo, al menos 0,8 mg/ml) a través de la química de acoplamiento ácido-amina estándar entre el ácido carboxílico y los grupos amina. La inmovilización de ligandos a través de grupos de ácido carboxílico activados también se puede aplicar directamente desde la superficie del soporte sólido sin formación de tentáculos.

V. Ensayo para medir el porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B

Los medios de cromatografía descritos en la presente memoria son útiles para la eliminación de anticuerpos anti-A y/o anti-B de una muestra (por ejemplo, sangre, hemoderivados, plasma, derivados del plasma o alimentación de IVIG).

Los medios de cromatografía descritos en la presente memoria incluyen un ligando antigénico del grupo sanguíneo A y/o un ligando antigénico del grupo sanguíneo B unidos a un soporte sólido a una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml de soporte sólido, y ofrecen una mayor flexibilidad con respecto al rango de condiciones de funcionamiento en las cuales se pueden usar, limpiar y/o desinfectar. Específicamente, los medios de cromatografía descritos en la presente memoria muestran estabilidad en condiciones ácidas y alcalinas, incluso después de la exposición a tales condiciones durante un período de tiempo prolongado. Por consiguiente, los medios de cromatografía descritos en la presente memoria mantienen la capacidad de eliminar anticuerpos anti-A y anti-B de una muestra tras la exposición a condiciones ácidas o alcalinas.

En general, el porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B de una muestra se puede medir de la siguiente manera. Una muestra 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. Posteriormente, la molécula que está unida al medio se separa de la disolución de muestra restante y se mide la concentración de la molécula en la disolución de muestra restante (es decir, la concentración de molécula sin unir). La concentración de la molécula en disolución se puede determinar mediante varios métodos diferentes conocidos en la técnica. La concentración de anticuerpos anti-A y anti-B también se puede determinar mediante ensayos de aglutinación que usan glóbulos rojos, ensayos de citometría de flujo como los que se basan en la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) de glóbulos rojos, y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) que utiliza materiales basados en antígenos.

En los métodos descritos en la presente memoria, la capacidad de un medio de cromatografía de eliminar anticuerpos anti-A y anti-B de una muestra se mide con y sin exposición a condiciones ácidas o alcalinas.

Las realizaciones se ilustran adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes. El contenido de todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas en esta solicitud, así como las Figuras, se incorporan en la presente memoria como referencia.

### Ejemplos

Ejemplo 1. Síntesis de medios que contienen un ligando de trisacárido A mediante química de aminación reductora (AR)

Se sintetizaron medios de ligandos antigénicos de trisacáridos del grupo sanguíneo A (TriA) inmovilizando los ligandos TriA sobre un soporte sólido poroso basado en poli(éter vinílico) patentado (en forma de esferas) usando la química de aminación reductora. Las estructuras específicas de los ligandos TriA y TriB se muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

Los ligandos se unieron a los grupos hidroxilo del soporte sólido. Se acondicionaron 10 ml de esferas sedimentadas con alcohol isopropílico y se transfirieron a un recipiente de reacción. Al recipiente de reacción se le agregaron 10 ml de alcohol isopropílico y 0,273 ml de una disolución de NaOH al 32%. La suspensión se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de la adición de 1,22 ml de 1,4-butanodiol diglicidil éter (BUDGE) a la suspensión. La suspensión se agitó durante 5 horas a temperatura ambiente. La suspensión se lavó usando un conjunto de filtros 3X con agua. Las esferas húmedas se transfirieron de nuevo al recipiente de reacción. Se añadieron 11,8 ml de agua y 0,26 ml de ácido acético glacial, y la suspensión se agitó durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. Las esferas se lavaron luego 3X con agua y se transfirieron de nuevo al recipiente de reacción.

Se añadieron 17 ml de ácido sulfúrico 0,5 M a las esferas y la suspensión se agitó durante 2 horas a 75 °C. Las esferas se lavaron varias veces para ajustar el pH de la suspensión entre 4 y 5. La disolución se aspiró utilizando un conjunto de filtros, y las esferas húmedas se devolvieron al recipiente de reacción. Al recipiente de reacción se le añadieron 10 ml de metaperyodato de sodio al 2,5% y la suspensión se agitó durante 2,5 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las esferas se lavaron 5 veces con agua para dar como resultado esferas de base de poli(éter vinílico) modificadas

con aldehído adecuadas para el acoplamiento con el ligando A o B.

5 Se transfirieron 10 ml de esferas de base húmeda modificadas con aldehído a un recipiente de reacción. A este recipiente se le añadieron 16,5 mg de trisacárido A, 10 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M y 150 mg de cianoborohidruro de sodio. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadieron 400 mg de glicina al recipiente de reacción, y la suspensión se agitó adicionalmente durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. El medio de cromatografía que contenía el ligando TriA resultante se lavó 5X con agua y 3X con tampón Tris a pH = 8. El medio se lavó adicionalmente 3X con disolución de ácido acético 0,05 M y 3X con agua, y finalmente se almacenó en disolución de etanol al 20%.

10 Posteriormente, se evaluó la capacidad del medio de eliminar los anticuerpos anti-A de una alimentación de IVIG, con y sin exposición a condiciones ácidas o alcalinas, como se describe a continuación en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 2. Síntesis de medio de cromatografía que contiene un ligando de trisacárido B mediante química de aminación reductora (RA)

15 El medio que contiene el ligando de trisacárido B se preparó de manera similar al medio que contiene el ligando de trisacárido A, como se describió anteriormente. Los 10 ml de esferas de base húmeda modificadas con aldehído, como se prepararon anteriormente, se transfirieron a un recipiente de reacción. A este recipiente se le agregaron 12,0 mg de trisacárido B, 10 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M y 150 mg de cianoborohidruro de sodio. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadieron 400 mg de glicina al recipiente de reacción, y la suspensión se agitó adicionalmente durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. El medio de cromatografía que contenía el ligando Tri B resultante se lavó 5X con agua y 3X con tampón Tris a pH = 8. El medio se lavó adicionalmente 3X con disolución de ácido acético 0,05 M y 3X con agua, y finalmente se almacenó en disolución de etanol al 20%.

20 Posteriormente, se evaluó la capacidad del medio de eliminar los anticuerpos anti-B de una alimentación de IVIG, con y sin exposición a condiciones ácidas o alcalinas, como se describe a continuación en los ejemplos siguientes.

Ejemplo 3. Síntesis de medio que contiene trisacárido A o B utilizando la química de tentáculos de poli(ácido acrílico) (pAA)

25 En este ejemplo representativo, se usó una química diferente, es decir, un enfoque de tentáculos de pAA, para unir los ligandos de trisacáridos A o B a esferas basadas en poli(éter vinílico).

Los ligandos antigénicos de los grupos sanguíneos A y B (trisacáridos A y B), como se muestran en las Figuras 1 y 2, se unieron a las esferas basadas en poli(éter vinílico) con grupos hidroxilo, en dos reacciones separadas, una para unir el ligando de trisacárido A a las esferas y otra para unir el ligando de trisacárido B a las esferas. En la primera etapa de la síntesis, las esferas se modificaron para incluir grupos carboxílicos para que reaccionasen con los grupos amina de los ligandos mostrados en las Figuras 1 y 2.

30 Se acondicionaron 10 ml de esferas sedimentadas con agua y se transfirieron a un recipiente de reacción. Se prepararon dos disoluciones, concretamente "disolución de monómero" y "disolución de iniciador", de la siguiente manera. Se prepararon 10 ml de disolución de monómero mezclando 0,137 ml de ácido acrílico, 0,1 ml de disolución de ácido nítrico al 65% y 9,763 ml de agua, y se prepararon 10 ml de disolución de iniciador mezclando 0,33 g de nitrato de cerio y amonio, 0,1 ml de disolución de ácido nítrico al 65% y 9,1 ml de agua. La disolución de monómero se añadió al recipiente de reacción que contenía esferas húmedas. La suspensión y la disolución de iniciador se purgaron con nitrógeno gaseoso durante aproximadamente 15 minutos. La disolución de iniciador se transfirió luego al recipiente de reacción y la suspensión se agitó durante 4 horas a 40 °C en una atmósfera de nitrógeno. Las esferas se lavaron 7X con agua, 10X con una disolución de ácido ascórbico 0,2 M y ácido sulfúrico 1 M, 5X con agua, 2X con tampón PBS y finalmente, 3X con agua.

35 Se transfirieron 10 ml de esferas húmedas modificadas con pAA a dos recipientes de reacción distintos. A un recipiente, se le añadieron 16,5 mg de trisacárido A, 10 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,01 M y 0,1 g de hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-(dimetilamino)propil)-carbodiimida (EDC). Al otro recipiente se le añadieron 12,0 mg de trisacárido B, 10 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,01 M y 0,1 g de EDC. Ambas suspensiones se agitaron a 32 °C durante 16 horas. Los medios de cromatografía resultantes se lavaron 3X con  $\text{NaHCO}_3$  0,01 M y 3X con agua, y las disoluciones de lavado se aspiraron usando un conjunto de filtros. Los medios se transfirieron nuevamente de vuelta a los recipientes de reacción, y se añadió un 5% v/v de disolución de etanolamina en  $\text{NaHCO}_3$  0,01 M a cada recipiente. Las suspensiones se agitaron durante 16 horas a temperatura ambiente y los medios se lavaron 5X con agua. Finalmente, los medios se almacenaron en etanol al 20%.

40 Los medios que contenían el ligando de trisacárido A o el ligando B, fabricados con el método de tentáculos de pAA descrito anteriormente, se evaluaron posteriormente con respecto a la eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B, respectivamente, de una alimentación de IVIG, con y sin exposición a condiciones ácidas o alcalinas, como se describe a continuación en los ejemplos posteriores.

Ejemplo 4. Efecto del pH de la carga de alimentación en la eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B

55 La eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B utilizando los medios descritos en la presente memoria se demostró en

condiciones de muestra que oscilaron desde pH 3,5 a pH 9,0. Se dializó una muestra (una alimentación de IVIG representativa) que contenía anticuerpos anti-A o anti-B en tampones que tenían diferentes valores de pH que variaban de 3,5 a 9,0. Las muestras de medios hechas con diferentes químicas de unión se pusieron en contacto posteriormente con los materiales de alimentación que tenían valores de pH variables.

- 5 Los medios de cromatografía realizados utilizando el enfoque RA o el enfoque de tentáculos de pAA, descritos anteriormente, se evaluaron posteriormente con respecto a la eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B de los diversos materiales de alimentación, como se describe a continuación.

10 Los niveles de anticuerpos hacia los antígenos del grupo sanguíneo A o B (anti-A/B) se determinaron utilizando un método de citometría de flujo establecido (Christensson, M. et al, Transfusion, 1996;36:500-505). Los glóbulos rojos de tipo A o tipo B se incubaron con una alimentación de IVIG representativa durante un tiempo predeterminado, seguido de lavados exhaustivos. Las células se tiñeron luego con IgGs anti-humanas marcadas con fluorescencia y se sometieron a citometría de flujo (Guava 5HT, EMD Millipore). Se usaron los valores netos de intensidad de fluorescencia media (IFM) para comparar los niveles de anticuerpos policlonales anti-A o anti-B en la alimentación de IVIG antes y después del contacto con un medio que contenía un ligando de trisacárido A o un ligando de trisacárido B. El porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B se calculó comparando el nivel de dichos anticuerpos en el flujo resultante (o sobrenadante) respecto del nivel en el material de alimentación inicial.

La siguiente tabla resume el porcentaje de eliminación de los anticuerpos anti-A o anti-B en cada condición de pH de carga de alimentación para dos materiales de alimentación de IVIG diferentes.

20 Para ambos materiales de alimentación, se observó una tendencia en la que los niveles más altos de pH ofrecían una mayor eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B. Se observó que los niveles de pH de 4,5 y superiores proporcionaron niveles de eliminación de anticuerpos anti-A de más del 65 por ciento. Para niveles de pH de 4,0 y superiores, los niveles de eliminación de anti-B fueron superiores al 65 por ciento. A niveles de pH aún más altos, pH 5,0-9,0, el porcentaje de eliminación fue cercano al 90 por ciento para la eliminación de anti-A y anti-B, lo que demuestra que dichos medios son efectivos en un amplio rango de pH de carga, y también funcionan mejor con un pH de carga más alto (por ejemplo, pH 5 a 9).

Tabla 1. Porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B a diferentes valores de pH de carga de alimentación

pH de carga de alimentación	Alimentación n° 1: % de eliminación de anti-A	Alimentación n° 1: % de eliminación de anti-B	Alimentación n° 2: % de eliminación de anti-A	Alimentación n° 2: % de eliminación de anti-B
3,5	34	53	44	39
4,0	44	67	56	71
4,5	70	91	66	86
5,0	81	89	84	90
5,5	86	92	89	93
7,5	89	94	91	93
9,0	89	90	87	89

Ejemplo 5. Evaluación de la estabilidad de los medios después de la exposición a PAB

30 En este Ejemplo, la estabilidad de los diferentes medios de cromatografía preparados en la presente memoria se evaluó después de la exposición a PAB (ácido fosfórico 120 mM, ácido acético 167 mM, alcohol bencílico al 2,2%), que se usa típicamente para la desinfección de materiales de cromatografía.

Los medios con dos niveles de carga de ligando diferentes, como se muestra en la Tabla 2, se evaluaron con respecto a la eliminación de anti-A y anti-B de dos muestras de alimentación de IVIG diferentes.

35 La estabilidad de los medios de cromatografía se demostró exponiendo el medio que contenía el ligando de trisacárido A o trisacárido B a PAB durante períodos de tiempo prolongados, es decir, al menos 50 o al menos 150 horas, y luego evaluando su capacidad de eliminar anticuerpos anti-A o anti-B de una alimentación de IVIG, como se describe a continuación.

40 Como se observó, los medios que contenían ligandos de trisacáridos A y B, realizados utilizando un enfoque RA o el enfoque de tentáculos de pAA, mostraron estabilidad después de la exposición a PAB, es decir, la capacidad de eliminar anticuerpos anti-A o anti-B de una alimentación de IVIG.

La estabilidad de los medios se midió mediante la evaluación de su capacidad de eliminar anticuerpos anti-A o anti-B de una alimentación de IVIG, como se describe a continuación.

- 5 Específicamente, los niveles de anticuerpos hacia los antígenos del grupo sanguíneo A o B (anti-A/B) se determinaron utilizando un método de citometría de flujo establecido (Christensson, M. et al, TRANSFUSION 1996; 36: 500-505). Los glóbulos rojos de tipo A o tipo B se incubaron con el material de alimentación durante un tiempo predeterminado, seguido de lavados exhaustivos. Las células se tiñeron luego con IgGs anti-humanas marcadas con fluorescencia y se sometieron a citometría de flujo (Guava 5HT, EMD Millipore). Se utilizaron los valores netos de intensidad de fluorescencia media (IFM) para comparar los niveles de anticuerpos policlonales anti-A o anti-B en el material de alimentación antes y después de la incubación con un medio que contenía un ligando de trisacárido A o un ligando de trisacárido B. El porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B se calculó comparando el nivel de dichos anticuerpos en el flujo resultante (o sobrenadante) respecto del nivel inicial en el material de alimentación.
- 10 Como se observa en la presente memoria, los medios de cromatografía que contenían un ligando de trisacárido A o de trisacárido B mantienen su capacidad de eliminar anticuerpos anti-A y anti-B, respectivamente, después de la exposición a PAB. No se observaron cambios significativos en las capacidades de eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B con respecto a una muestra de control que no estuvo expuesta a PAB (indicado por "0 horas" de exposición a PAB en la tabla siguiente). Para la Alimentación 1, aproximadamente el 80% o más de los anticuerpos anti-A o anti-B se eliminaron tanto en el caso del control como después de la exposición a PAB. Para la alimentación 2, aproximadamente el 90% de anti-A o anti-B se eliminó tanto en el caso del control como después de la exposición a PAB.

Tabla 2. Porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B antes y después de la exposición a PAB a dos niveles de carga de ligando

Tiempo de exposición a PAB	Carga de ligando (gm/ml)	Alimentación nº 1: % de eliminación de anti-A	Alimentación nº 2: % de eliminación de anti-A	Alimentación nº 1: % de eliminación de anti-B	Alimentación nº 2: % de eliminación de anti-B
0 horas	TriA-1.65 o TriB-1.20	79	90	80	92
0 horas	TriA-2.80 o TriB-2.1	82	90	76	92
50 horas	TriA-1.65 o TriB-1.20	80	91	82	93
50 horas	TriA-2.80 o TriB-2.1	81	92	84	91
150 horas	TriA-1.65 o TriB-1.20	83	91	81	90
150 horas	TriA-2.80 o TriB-2.1	81	92	82	93

- 20 Ejemplo 6. Los medios que contienen ligandos de trisacárido A y de trisacárido B son estables en condiciones ácidas
- Se demostró que los medios que contienen ligandos de trisacáridos A y B descritos en la presente memoria exhiben estabilidad química después de la exposición a una variedad de ácidos y disoluciones tampón de bajo pH, por ejemplo, tampón de glicina 0,1 M, pH 2,0; tampón de glicina 0,1 M, pH 2,2; tampón de glicina 0,1 M, pH 2,5; tampón de glicina 0,1 M, pH 2,7; y tampón de glicina 0,1 M, pH 3,0.
- 25 La estabilidad en condiciones ácidas se demostró exponiendo los diferentes medios a condiciones ácidas durante un período de tiempo específico, por ejemplo, al menos 50 horas, y luego evaluando los medios para determinar su capacidad de eliminar el anticuerpo anti-A y anti-B de dos materiales de alimentación. También se evaluó una muestra de control que no se expuso a ningún ácido para determinar su capacidad de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B.
- 30 Como se observa en la presente memoria, los medios que contienen trisacáridos A y B mantienen su capacidad de eliminar los anticuerpos anti-A o anti-B, respectivamente, incluso después de una exposición prolongada a condiciones ácidas. Las muestras que habían estado expuestas a las disoluciones ácidas mantuvieron su capacidad de eliminar aproximadamente el 80 por ciento o más de anticuerpos anti-A y anti-B de ambos materiales de alimentación.

Tabla 3. Porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A o anti-B después de la exposición a ácido

Condición de exposición a ácido	Alimentación nº 1: % de eliminación de anti-A	Alimentación nº 1: % de eliminación de anti-B	Alimentación nº 2: % de eliminación de anti-A	Alimentación nº 2: % de eliminación de anti-B
Control (Sin Exposición a Ácido)	79	80	90	92

Ácido cítrico, pH 2,7	87	90	87	81
Ácido acético, pH 2,8	86	91	86	92
Glicina, pH 2,2	87	90	86	93
Glicina, pH 2,5	89	91	88	93
Glicina, pH 2,7	89	92	86	94
Glicina, pH 3,0	88	92	86	87

Se demostró además que los medios que contienen ligandos de trisacárido A y de trisacárido B mantienen la capacidad de unirse y purificar los anticuerpos IgM-A e IgM-B, respectivamente, después de la desinfección en condiciones ácidas.

- 5 Los medios que contienen ligandos de trisacáridos A y B que se describen en la presente memoria se evaluaron para determinar su estabilidad en condiciones ácidas o de pH bajo, por ejemplo, PAB. Esto se demostró exponiendo los medios a PAB durante períodos de tiempo específicos, por ejemplo, al menos 50 horas o 150 horas, y luego evaluando la capacidad de unión de IgM-A e IgM-B. Se usó una muestra de control que no había sido expuesta a PAB como base para calcular la capacidad de unión retenida mediante el uso de la siguiente ecuación.

$$10 \quad \text{Capacidad retenida (\%)} = 100 \times \frac{\text{Capacidad de unión}_{t=0 \text{ horas}} - \text{Capacidad de unión}_{t=t \text{ horas}}}{\text{Capacidad de unión}_{t=0 \text{ horas}}}$$

La Tabla 4 siguiente demuestra la capacidad de unión de IgM-A e IgM-B retenida de los medios que contienen ligandos de trisacárido A y de trisacárido B después de la exposición a condiciones ácidas.

Tabla 4

Tiempo de exposición a PAB (horas)	Capacidad de unión de IgM-A retenida (%)	Capacidad de unión de IgM-B retenida (%)
50	96	100
150	95	95

- 15 Ejemplo 7. Los medios que contienen ligandos de trisacárido A y de trisacárido B son estables en condiciones alcalinas

Los medios que contienen ligandos de trisacáridos A y B que se describen en la presente memoria se evaluaron para determinar su estabilidad en condiciones alcalinas o de pH alto, por ejemplo, NaOH 0,5 M. Esto se demostró al exponer el medio a NaOH 0,5 M durante períodos de tiempo específicos, por ejemplo, al menos 50 horas o 150 horas, y luego evaluar las capacidades de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B de los medios de dos materiales de alimentación IVIG diferentes. También se evaluó la capacidad de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B en una muestra de control que no se había expuesto a NaOH.

- 20 Como se observa en la presente memoria, los medios que contienen trisacáridos A y B mantienen su capacidad de eliminar anticuerpos anti-A y anti-B, respectivamente, incluso después de una exposición prolongada a condiciones alcalinas. Incluso después de 150 horas de exposición a NaOH, los medios fueron capaces de eliminar aproximadamente el 75 por ciento de anticuerpo anti-A y aproximadamente el 88 por ciento de anticuerpo anti-B.

Tabla 5. Porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B después de la exposición a NaOH 0,5 M

Tiempo de exposición a NaOH	Alimentación n° 1: % de eliminación de anti-A	Alimentación n° 1: % de eliminación de anti-B	Alimentación n° 2: % de eliminación de anti-A	Alimentación n° 2: % de eliminación de anti-B
0 horas	91	90	84	87
50 horas	86	88	82	87
150 horas	75	88	77	90

- 30 En un experimento adicional, se mostró que los medios que contienen ligandos de trisacárido A y de trisacárido B mantenían la capacidad de unir y purificar anticuerpos IgM-A e IgM-B, respectivamente, después de la desinfección en condiciones alcalinas.

Los medios que contienen trisacáridos A y B que se describen en la presente memoria se evaluaron para determinar su estabilidad en condiciones alcalinas o de pH alto, por ejemplo, NaOH 0,5 M. Esto se demostró exponiendo el medio a NaOH 0,5 M durante períodos de tiempo específicos, por ejemplo, al menos 50 horas o 150 horas, y luego evaluando la capacidad de unión de IgM-A e IgM-B. Se usó una muestra de control que no se había expuesto a NaOH como base para calcular la capacidad de unión retenida mediante la ecuación mostrada en el Ejemplo anterior.

La capacidad de unión de IgM-A e IgM-B retenida de los medios que contienen ligandos de trisacárido A y de trisacárido B después de la exposición a condiciones alcalinas se muestra en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Tiempo de exposición a NaOH (horas)	Capacidad de unión de IgM-A retenida (%)	Capacidad de unión de IgM-B retenida (%)
50	94	100
150	92	97

10 Ejemplo 8. Efecto de la carga de ligando sobre la eliminación de anticuerpos anti-A

El efecto de la carga de ligando sobre el porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B mediante los medios de cromatografía descritos en la presente memoria se determinó como sigue.

Se incubaron medios de trisacárido A o de trisacárido B que tenían diferentes cargas de ligando con una alimentación IVIG representativa, y se determinó la eliminación del anticuerpo anti-A utilizando el ensayo de citometría de flujo descrito anteriormente en la presente memoria.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente. Se descubrió que a medida que aumenta la carga de ligando de trisacárido A, el % de eliminación de anticuerpos anti-A aumentó para el rango de carga de ligando probado. Para la química de tentáculos de pAA, se obtuvo una eliminación superior al 70% de los anticuerpos anti-A con cargas de ligando de 1,65 mg/ml o más, y se obtuvo una eliminación superior al 80% con cargas de ligando de 2,1 mg/ml. En comparación, para la química de AR, se obtuvo una eliminación superior al 80% de los anticuerpos anti-A con cargas de ligando de 1,2 mg/ml o más.

Este resultado fue bastante inesperado, como anteriormente, se informó que tener una menor densidad de ligandos (lo que significaría una menor carga de ligandos) sería deseable para que dichos medios funcionen de manera efectiva (véase la publicación n° WO2015/001277).

25 Tabla 7. Efecto de la carga de ligando en el porcentaje de eliminación de anticuerpo anti-A para dos muestras de medios distintos

Carga de ligando (g/lit)	% de eliminación de anticuerpo anti-A (química pAA)	% de eliminación de anticuerpo anti-A (química RA)
1,2	74	81
1,5	N/A	83
1,65	78	N/A
2,1	80	82
2,8	82	N/A
3,5	85	83
4,2	87	84

Ejemplo 9. Efecto de la carga de ligando en la eliminación de anticuerpos anti-B

Se investigó el efecto de la carga de ligando sobre la capacidad de un medio de cromatografía que contiene un ligando TriB descrito en la presente memoria de eliminar anticuerpos anti-B de una alimentación IVIG representativa.

El efecto de esta carga de ligando se demostró incubando la alimentación con muestras de medios que contienen diferentes cargas de ligando, y luego midiendo la eliminación de anticuerpo anti-B utilizando el ensayo de citometría de flujo, como se describió anteriormente en la presente memoria. Los resultados se muestran en la tabla siguiente. Se observó que a medida que aumenta la carga de ligando de trisacárido B, aumenta el % de eliminación de anticuerpos anti-B para el rango de cargas de ligando probado.

Para el enfoque de química de tentáculos de pAA, se obtuvo una eliminación mayor del 70% de anticuerpos anti-B con cargas de ligando de 1,2 mg/ml o más, y se obtuvo una eliminación mayor del 80% con cargas de ligando de 1,65

mg/ml, y se obtuvo más del 90% de eliminación con cargas de ligando de 2,8 mg/ml o más. En comparación, para la química de AR, se obtuvo una eliminación superior al 90% de los anticuerpos anti-B con cargas de ligando de 1,2 mg/ml o más.

- 5 Como se discutió anteriormente, este resultado fue bastante inesperado como anteriormente, se informó que tener una menor densidad de ligando (lo que significaría una menor carga de ligando) sería deseable para que dichos medios funcionen de manera efectiva (véase la publicación n° WO2015/001277).

Tabla 8. Efecto de la carga de ligando sobre el porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-B

Carga de ligando (g/lit)	% de eliminación de anticuerpos anti-B (química pAA)	% de eliminación de anticuerpos anti-B (química RA)
1,2	78	91
1,65	88	93
2,1	87	92
2,8	91	93
3,5	92	91

Ejemplo 10. Eliminación secuencial de anticuerpos anti-A y anti-B de una muestra

- 10 Los medios de cromatografía descritos en la presente memoria pueden usarse secuencialmente para la eliminación de anticuerpos tanto anti-A como anti-B de una muestra. En otras palabras, se puede usar primero un medio de cromatografía para la eliminación de anticuerpos anti-A y luego un medio de cromatografía para la eliminación de anticuerpos anti-B. Alternativamente, se puede usar primero un medio de cromatografía para la eliminación de anticuerpos anti-B, seguido de un medio de cromatografía para eliminar anticuerpos anti-A.

- 15 En este experimento, se hizo pasar primero un material de alimentación de IVIG a través de una columna que contenía un medio de cromatografía que contenía un ligando de trisacárido A, seguido de una columna distinta que contenía un medio de cromatografía de ligando de trisacárido B. La eliminación de los anticuerpos anti-A y anti-B se determinó mediante citometría de flujo. También se demostró el orden opuesto, donde la alimentación se puso en contacto primero con un medio de cromatografía que contenía un ligando de trisacárido B, seguido de un medio de cromatografía que contenía un ligando de trisacárido A.

La siguiente tabla muestra el porcentaje total de anticuerpos anti-A y anti-B eliminados de la alimentación utilizando estos métodos. Al menos el 87 por ciento del anticuerpo anti-A se eliminó después de hacer pasar el material de alimentación a través de ambos medios. Al menos el 92 por ciento del anticuerpo anti-B se eliminó después de hacer pasar el material de alimentación a través de ambos medios.

- 25 Tabla 9. Porcentaje de eliminación de anticuerpos anti-A y anti-B después del uso secuencial de dos medios de cromatografía diferentes

Tren de proceso	% de eliminación de anticuerpos anti-A	% de eliminación de anticuerpos anti-B
trisacárido A → trisacárido B	87	95
trisacárido B → trisacárido A	91	92

Ejemplo 11. Purificación de anticuerpo monoclonal IgM-A murino

- 30 Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden usar para purificar un anticuerpo monoclonal IgM de una alimentación clarificada de cultivo celular que expresa un anticuerpo IgM. Este experimento describe la purificación de un anticuerpo IgM-A de una alimentación clarificada de cultivo celular. En algunas realizaciones, se usa una molécula de IgM-A purificada como molécula modelo para evaluar la calidad de un medio de cromatografía que contiene un ligando antigénico del grupo sanguíneo A, como se describe en la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. N° 62/215,423, presentada el 8 de septiembre de 2015.

- 35 El anticuerpo monoclonal IgM murino hacia el antígeno del grupo sanguíneo A (anti-A) se purificó a partir de una alimentación clarificada de cultivo celular disponible comercialmente que contenía la IgM anti-A producida a partir del clon BIRMA-1 (Vox Sang., 1991, 61: 53-58) que se dializó en tampón PBS 10 mM (número de producto: JH-1L-BK, EMD Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). La alimentación del cultivo celular anti-A se filtró a través de una membrana de 0,22 micrones y se sometió a cromatografía de unión/elución en un medio que tenía ligandos antigénicos de trisacáridos del grupo sanguíneo A (TriA) unidos al mismo, como se describe en la presente memoria.

5 Se empaquetó una columna de 10 mm de diámetro hasta 64 mm con el medio de ligando Tri-A. La columna se equilibró con tampón PBS 10 mM (10 volúmenes de columna (VC) a 305,58 cm/h, 4,0 mL/min) y posteriormente se cargó con la alimentación clarificada de cultivo celular que contenía anti-A en PBS 10 mM (40 VC, 229,18 cm/h, 3,0 mL/min). La columna se lavó con tampón PBS 10 mM (5 VC, 305,58 cm/h, 4,0 mL/min), seguido de cloruro sódico 0,5 M en tampón PBS 10 mM (10 CV, 305,58 cm/h, 4,0 mL/min). Luego, el anticuerpo IgM anti-A se eluyó de la columna con glicina 0,1 M a pH 2,7 (9 VC, 305,58 cm/h, 4,0 mL/min). La columna se lavó posteriormente con tampón PBS 10 mM (10 VC, 305,58 cm/h, 4,0 mL/min) y se eliminó con hidróxido de sodio 0,5 M (10 VC, 305,58 cm/h, 4,0 mL/min) antes de otras utilidades.

10 Se añadió 1 ml de Tris base 2,0 M a 45 ml de la IgM anti-A eluida para aumentar el pH de la disolución a 6-7. La elución se dializó posteriormente en PBS 10 mM utilizando tubos de diálisis (Kits de ensayo de diálisis RC estándar, Spectra/Por® 1-3, 3.5K MWCO, ancho plano de 54 mm, número de serie: 132725, Spectrum Laboratories, Inc. Rancho Dominguez, CA, 90220, EE. UU.). Después de la diálisis en PBS 10 mM, se descubrió que la disolución resultante de IgM monoclonal anti-A tenía una concentración de aproximadamente 1,1 mg/ml basada en un coeficiente de extinción de 1,50 a 280 nm, según lo determinado en base a la composición de aminoácidos del anticuerpo IgM. Se descubrió que el anticuerpo monoclonal IgM anti-A tenía una pureza del 97% según lo determinado mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño.

#### Ejemplo 12. Purificación del anticuerpo monoclonal IgM-B murino

20 El anticuerpo monoclonal IgM murino hacia el antígeno del grupo sanguíneo B (anti-B) se purificó a partir de una alimentación clarificada de cultivo celular disponible comercialmente que contenía la IgM anti-B producida a partir del clon LB-2 que se dializó en tampón PBS 10 mM (número de producto: JM-1L-BK, EMD Millipore, Billerica, MA, EE. UU.). La alimentación del cultivo de células anti-B se filtró a través de una membrana de 0,22 micrones y se sometió a cromatografía de unión/elución en un medio con ligandos antigénicos de trisacáridos del grupo sanguíneo B (TriB) unidos al mismo, como se describe en la presente memoria.

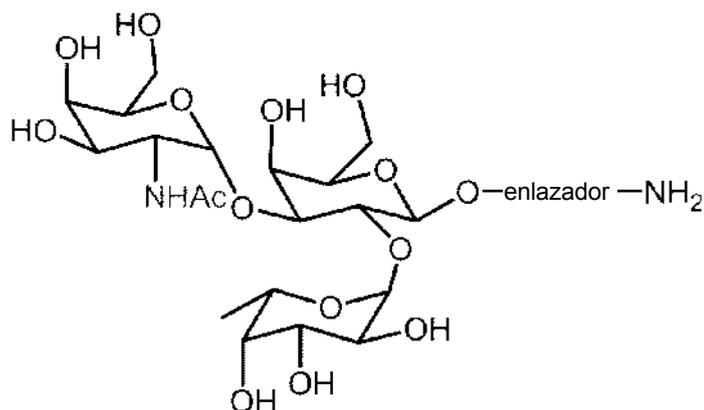
25 Se empaquetó una columna de 10 mm de diámetro hasta 64 mm con el medio de ligando TriB. La columna se equilibró con tampón PBS 10 mM (10 VC a 305,58 cm/h, 4,0 mL/min) y posteriormente se cargó con la alimentación clarificada de cultivo celular que contenía el anticuerpo monoclonal anti-B en PBS 10 mM (40 VC, 229,18 cm/h, 3,0 mL/min). La columna se lavó con tampón PBS 10 mM (5 VC, 305,58 cm/h, 4,0 mL/min), seguido de cloruro sódico 0,5 M en tampón PBS 10 mM (10 VC, 305,58 cm/h, 4,0 mL/min). Luego, el anticuerpo anti-B se eluyó de la columna con glicina 0,1 M a pH 2,7 (9 VC, 305,58 cm/h, 4,0 mL/min). La columna se lavó posteriormente con tampón PBS 10 mM (10 VC, 305,58 cm/h, 4,0 mL/min) y se eliminó con hidróxido de sodio 0,5 M (10 VC, 305,58 cm/h, 4,0 mL/min) antes de otras utilidades.

35 Se añadió 1 ml de Tris base 2,0 M a 45 ml del eluido anti-B para aumentar el pH de la disolución a 6-7. La elución se dializó en PBS 10 mM utilizando tubos de diálisis (Kits de ensayo de diálisis RC estándar, Spectra/Por® 1-3, 3.5K MWCO, ancho plano de 54 mm, número de serie: 132725, Spectrum Laboratories, Inc. Rancho Dominguez, CA, 90220, EE. UU.). Después de la diálisis en PBS 10 mM, la disolución resultante de la IgM monoclonal murina anti-B tuvo una concentración de aproximadamente 1,3 mg/mL basada en un coeficiente de extinción de 1,44 a 280 nm, según lo determinado en función de la composición de aminoácidos de la proteína. Se descubrió que el anticuerpo monoclonal IgM anti-A tenía una pureza del 98% según lo determinado mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño.

40 A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, cultivos celulares, condiciones de tratamiento, etc., utilizados en la memoria descriptiva, incluidas las reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos son aproximaciones y pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante las realizaciones descritas en la presente memoria. A menos que se indique lo contrario, el término "al menos" que precede a una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento de la serie. Los expertos en la materia reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas descritas en la presente memoria. Dichos equivalentes están destinados a incluirse en las siguientes reivindicaciones.

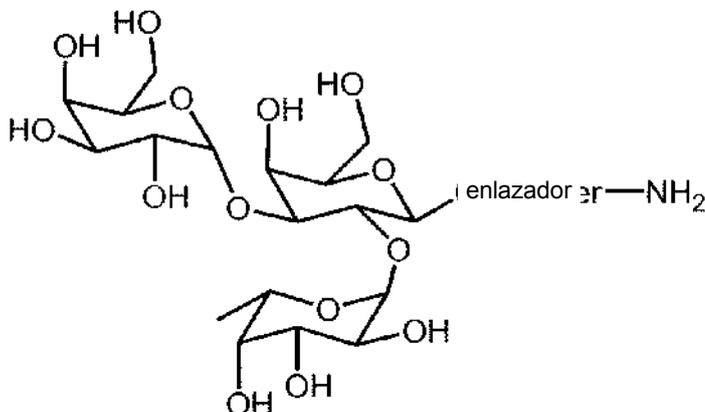
**REIVINDICACIONES**

1. Una columna de cromatografía empaquetada con un medio para eliminar anticuerpos anti-A de una muestra, y el medio comprende un soporte sólido con un ligando antigénico del grupo sanguíneo A unido al mismo, en donde:
  - (a) el ligando se une al soporte sólido a una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml de soporte sólido; y
  - 5 (b) el medio es estable en condiciones ácidas y/o alcalinas; y
  - (c) Los ligandos antigénicos del grupo sanguíneo A se unen mediante una química de aminación reductora o una química de tentáculos de pAA a un soporte sólido.
  
2. Una columna de cromatografía empaquetada con un medio para eliminar anticuerpos anti-B de una muestra, y el medio comprende un soporte sólido con un ligando antigénico del grupo sanguíneo B unido a él, en donde:
  - 10 (a) el ligando se une al soporte sólido a una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml de soporte sólido y;
  - (b) el medio es estable en condiciones ácidas y/o alcalinas; y
  - (c) los ligandos antigénicos del grupo sanguíneo B se unen mediante una química de aminación reductora o una química de tentáculos de pAA al soporte sólido.
  
3. Una columna de cromatografía empaquetada con un medio para eliminar anticuerpos anti-A y anti-B de una muestra, y el medio comprende:
  - 15 (a) un soporte sólido con un ligando antigénico del grupo sanguíneo A y con un ligando antigénico del grupo B unidos a él, cada uno a una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml de soporte sólido; o
  - (b) una mezcla de dos soportes sólidos, uno que comprende un ligando antigénico del grupo sanguíneo A y otro que comprende un ligando antigénico del grupo B, y cada medio tiene una carga de ligando de al menos 0,8 mg/ml de soporte sólido, en donde el medio es estable en condiciones ácidas y/o alcalinas y los ligandos antigénico del grupo sanguíneo A y/o B se unen mediante una química de aminación reductora o una química de tentáculos de pAA al soporte sólido.
  - 20
  
4. La columna de cromatografía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la carga de ligando es al menos 1 mg/ml de soporte sólido; y en cuyo caso opcionalmente:
  - 25 a) al menos 1,5 mg/ml de soporte sólido o al menos 1,65 mg/ml de soporte sólido, si el ligando es un ligando antigénico del grupo sanguíneo A; o
  - b) al menos 1,2 mg/ml de soporte sólido si el ligando es un ligando antigénico del grupo sanguíneo B.
  
5. La columna de cromatografía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el soporte sólido comprende:
  - 30 a) un polímero seleccionado del grupo que consiste en poli(éter vinílico), poli(alcohol vinílico), polimetacrilato, poliacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilamida y policarbonato; o
  - b) es una esfera basada en poli(éter vinílico).
  
6. La columna de cromatografía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el ligando tiene:
  - 35 a) la siguiente estructura:



cuando el ligando es un ligando del grupo sanguíneo A; o

b) la siguiente estructura:



5 cuando el ligando es un ligando del grupo sanguíneo B.

7. La columna de cromatografía de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el medio es estable después de la exposición a al menos 50 horas de condiciones ácidas y/o alcalinas.

8. Un método para desinfectar la columna de cromatografía de acuerdo con cualquier reivindicación precedente después del uso, mientras se mantiene la capacidad del medio de eliminar anticuerpos anti-A o anticuerpos anti-B, respectivamente, de una muestra, en donde el método comprende poner en contacto la columna de cromatografía con una disolución que contiene ácido fosfórico, ácido acético y alcohol bencílico durante al menos tres horas.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que mantener la capacidad de eliminar anticuerpos anti-A o anticuerpos anti-B comprende la capacidad del medio de eliminar al menos el 50% de los anticuerpos anti-A o anti-B de una muestra.

10. Un método para purificar un anticuerpo monoclonal IgM anti-A de una alimentación clarificada de cultivo celular, y el método comprende las etapas de:

- (a) proporcionar una alimentación clarificada de cultivo celular que contiene un anticuerpo monoclonal IgM anti-A;
- (b) incubar la alimentación con la columna de cromatografía de acuerdo con la reivindicación 1 o las reivindicaciones dependientes de la misma para facilitar la unión del anticuerpo IgM anti-A al medio;
- (c) lavar el medio con un tampón acuoso que tiene un pH que varía de 3,5 a 9,0;
- (d) eluir el anticuerpo IgM anti-A del medio usando un tampón que tiene un pH que varía de 2,0 a 3,0, para obtener de este modo un eluato; y
- (e) recuperar el anticuerpo IgM anti-A purificado en el eluato.

11. Un método para purificar un anticuerpo monoclonal IgM anti-B de una alimentación clarificada de cultivo celular, y el método comprende las etapas de:

- 5
- (a) proporcionar una alimentación clarificada de cultivo celular que contiene un anticuerpo monoclonal IgM anti-B;
  - (b) incubar la alimentación con la columna de cromatografía de acuerdo con la reivindicación 2 o las reivindicaciones dependientes de la misma para facilitar la unión del anticuerpo IgM anti-B al medio;
  - (c) lavar el medio con un tampón acuoso que tiene un pH que varía de 3,5 a 9,0;
  - (d) eluir el anticuerpo IgM anti-B del medio utilizando un tampón que tiene un pH que varía de 2,0 a 3,0, para obtener un eluato; y
  - (e) recuperar el anticuerpo IgM anti-B purificado en el eluato.

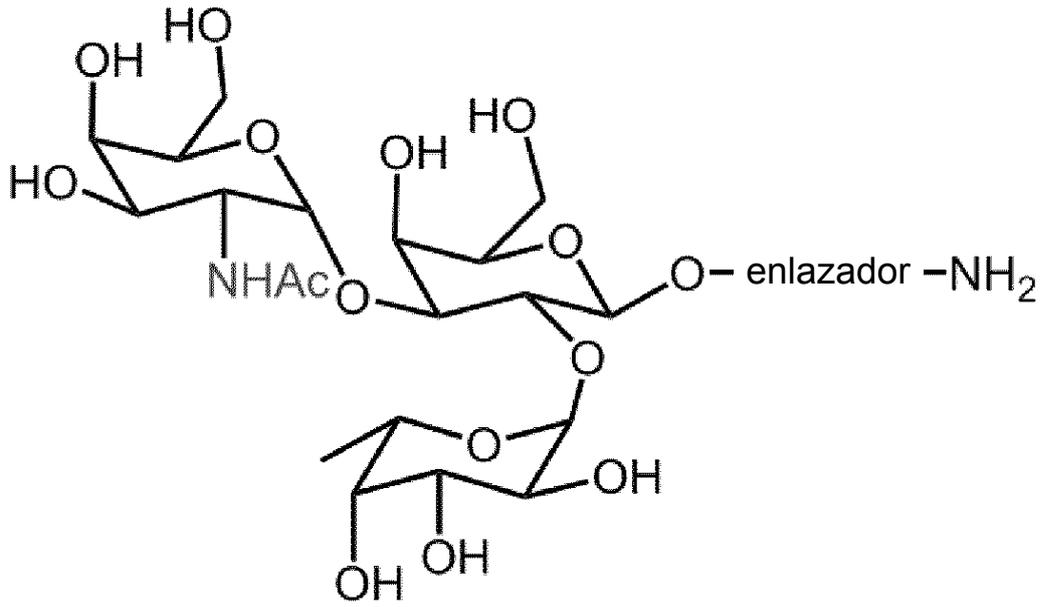


Figura 1

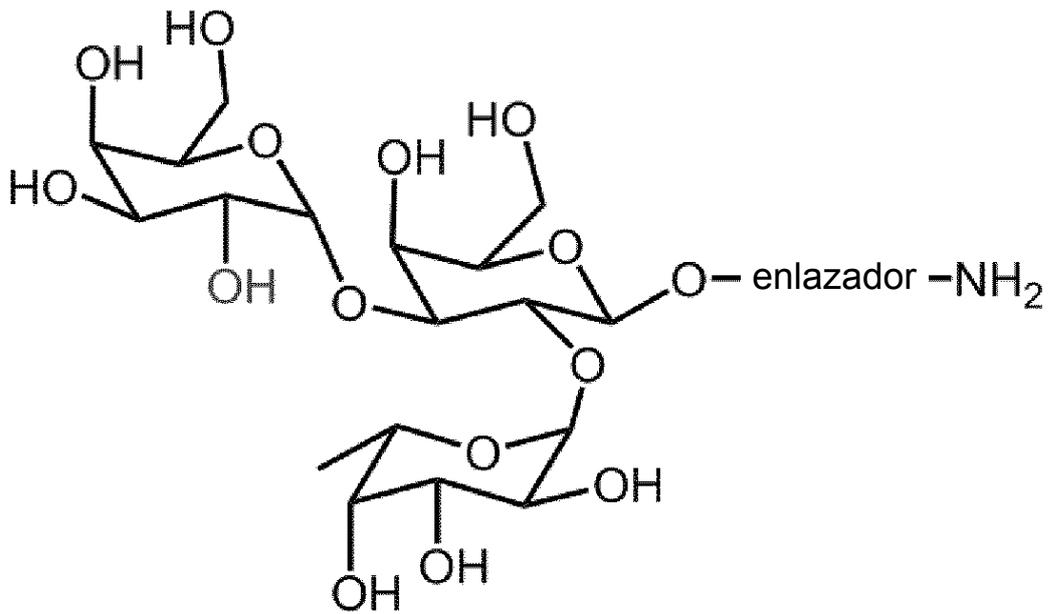


Figura 2