

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 798**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2012 PCT/IL2012/000189**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2012 WO12156963**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2012 E 12726891 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2710026**

54 Título: **Inmunoglobulina reducida en agentes trombogénicos y preparación de la misma**

30 Prioridad:

16.05.2011 IL 21291111

16.05.2011 US 201161486386 P

24.10.2011 US 201161550581 P

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

27.04.2020

73 Titular/es:

OMRIX BIOPHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)

Bldg.14 Weizmann Science Park P.O. Box 619

Rehovot 76106, IL

72 Inventor/es:

MINTZ, RONI;

BELYAEV, OLEG;

NUR, ISRAEL;

BAR, LILIANA y

MEIDLER, ROBERTO

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 756 798 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).

DESCRIPCION

Inmunoglobulina reducida en agentes trombogénicos y preparación de la misma

5 Campo de la invención

La invención se refiere a una preparación de inmunoglobulina que comprende bajos niveles de agentes trombogénicos.

10 Antecedentes de la invención

Las preparaciones de inmunoglobulina intravenosa (IVIG) se usan cada vez más para el tratamiento de una variedad de deficiencias inmunológicas y trastornos autoinmunes que incluyen la dermatomiositis, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Kawasaki y síndrome de Guillain-Barré.

15 Un pequeño número de eventos adversos tromboembólicos se ha asociado con el uso de preparaciones de IVIG (Brannagan et al. Complicaciones del tratamiento con inmunoglobulina intravenosa en enfermedades neurológicas. *Neurology* 1996;47:674-677; Rosenbaum JT. El infarto de miocardio como una complicación de la con inmunoglobulina *Arthritis Rheum* 1997;40:1732-1733 y Dalakas MC. La inmunoglobulina intravenosa en dosis altas y la viscosidad del suero: riesgo de precipitar eventos tromboembólicos. *Neurology* 1994;44: 223-226).

20 Estos eventos, que incluyen trombosis venosa profunda e infarto de miocardio, se han observado principalmente en pacientes que reciben dosis altas de IVIG, y se les ha atribuido a un aumento en la viscosidad de la sangre (Dalakas MC. 1994; y Reinhart WH, Berchtold PE. Efecto de terapia con inmunoglobulina intravenosa a dosis altas sobre la reología sanguínea. *Lancet* 1992;339:662-664).

25 Los componentes del sistema de contacto de la coagulación sanguínea se han identificado anteriormente en preparaciones de inmunoglobulina humana (Alving et al. Factores activados por contacto: contaminantes de preparaciones de inmunoglobulina con propiedades coagulantes y vasoactivas. *J Lab Clin Med* 1980; 96:334-346). Se demostró que las preparaciones comerciales de inmunoglobulina sérica contienen niveles ampliamente variables de activador de precalicreína (PKA) y actividad de calicreína. Estas actividades fueron de interés debido a su potencial para producir péptidos bioactivos que pueden aumentar la permeabilidad vascular. Se pensó que la presencia de fragmentos vasoactivos de estas proteínas estaba relacionada con reacciones adversas ocasionales durante la administración de preparaciones de inmunoglobulina. Estos autores también descubrieron el factor XI (FXI) en preparaciones de inmunoglobulina (Alving et al. 1980).

30 En Alving et al. (1980) se analizaron veinticinco lotes de globulinas de suero inmunes (ISG) comerciales para detectar PKA y calicreína, los componentes del sistema de activación por contacto, que podrían mediar tales reacciones a través de la generación de cininas en los receptores. La actividad de calicreína varió de niveles indetectables a >60% de la actividad de calicreína potencial total en plasma normal. El PKA varió del 5% al 3950% de la actividad en una fracción de proteína plasmática de referencia que había provocado hipotensión. Todos menos cinco lotes aumentaron la permeabilidad vascular en el conejillo de indias. Los cinco lotes que no provocaron aumento también fueron los más bajos en la actividad de PKA y de calicreína. Cuando la preparación de inmunoglobulina se sometió a cromatografía en gel para separar los contaminantes enzimáticos de la inmunoglobulina G, solo las fracciones que contenían PKA y/o calicreína aumentaron la permeabilidad vascular. Varios lotes de IVIG acortaron el tiempo de tromboplastina parcial no activada del plasma normal de 236 segundos a de 38 a 55 segundos. Durante la cromatografía en gel, la actividad coagulante se eluyó en una posición correspondiente a un peso molecular de 150.000; que fue inhibido por el anticuerpo para el factor XI humano. Estos datos indican que el factor XIa es responsable de la actividad procoagulante observada y que la PKA y/o la calicreína son mediadores potenciales de reacciones vasoactivas para la preparación de IVIG.

35 También se ha descubierto que las inmunoglobulinas contaminan las preparaciones de factor XI. El factor XI y las inmunoglobulinas se purifican conjuntamente mediante columnas de intercambio iónico sucesivas y requieren la adición de una columna de cromatografía de afinidad de concanavalina A específica para eliminar las trazas de contaminación por IgG del factor XI (Bonno BN, Griffin JH. Factor XI de coagulación de la sangre humana: purificación, propiedades y mecanismo de activación por el factor XII activado. *J Biol Chem* 1977;252:6432-6437).

40 Wolberg et al. (El factor XI de coagulación es un contaminante en las preparaciones de inmunoglobulina intravenosa. *Am J Hem* 2000; 65:30-34) demostraron que un procoagulante, identificado como factor XI activado, está presente en las preparaciones de IgG. En este estudio, se analizaron veintinueve muestras de inmunoglobulina intravenosa (IVIG) de ocho fabricantes diferentes para su actividad procoagulante. Veintiséis de estas muestras acortaron el tiempo de coagulación del plasma deficiente en factor XI. De estas, catorce muestras tenían actividades de factor XI mayores de 0,001 U/ml de plasma agrupado normal. Las muestras restantes poseían menos de 0,001 U/ml de actividad en plasma normal. La actividad procoagulante en estas muestras podría ser inhibida por un anticuerpo policlonal anti-factor XI, lo que sugiere que la actividad procoagulante era el factor XI. La actividad

procoagulante aumentó en dos muestras después del almacenamiento a 4° C durante 4 semanas, probablemente como resultado de la autoactivación del factor XIa. Adicionalmente, la actividad en algunas muestras de IVIG fue capaz de activar directamente el factor IX, indicando que el factor XI activado estaba presente en estas muestras.

5 Durante los últimos 3 siglos, se han desarrollado numerosos métodos para la purificación de la inmunoglobulina intravenosa para satisfacer la creciente demanda de IVIG. La gran mayoría del proceso de fabricación incluye varias tecnologías para capturar la inmunoglobulina en una resina dedicada, habitualmente una resina de intercambio iónico (Jerry Siegel. El producto: Todas las inmunoglobulinas intravenosas no son equivalentes. The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy. Volumen 25, Número 11 Parte 2, noviembre de 2005) La captura de inmunoglobulina en una resina es muy costosa y lleva mucho tiempo, ya que requiere una gran cantidad de resina. De media, cada litro de resina de intercambio iónico captura aproximadamente 30-50 g de inmunoglobulina. Por lo tanto, cuando se usa una columna grande convencional con una capacidad de aproximadamente 100 l de resina, pueden capturarse 3-5 kg de inmunoglobulina. La captura de los agentes presentes en la solución de inmunoglobulina en una columna pequeña tiene un beneficio económico.

15 La patente de Estados Unidos 5252217 divulga un concentrado de Factor XI humano preparado aplicando un sobrenadante de plasma crioprecipitado a un paso de filtración-adsorción y un único paso de cromatografía sobre resina de intercambio catiónico. El concentrado obtenido es perfectamente adecuado para uso terapéutico en terapia de reemplazo en casos de deficiencia de Factor XI. La resina de intercambio catiónico se equilibra con una solución tampón a un pH de 5,5 a 6,5, y preferiblemente un pH de 6.

20 La Patente de Estados Unidos 4272521 divulga un método para la eliminación tanto del activador de precalicreína (PKA) como del precursor activable de calicreína para PKA (Factor XII) de una solución de inmunoglobulina sérica (ISG) usando un material de intercambio iónico a un pH de $\geq 7,2$.

25 La Patente de Estados Unidos 5164487 divulga un método de fabricación de una preparación de inmunoglobulina G intravenosamente tolerable que está libre de agregados, sustancias vasoactivas y enzimas proteolíticas. El material de partida se trata con de un 0,4 a un 1,5% en volumen de ácido octanoico y luego se cromatografía, especialmente en un intercambiador de iones o cationes o matriz hidrófoba.

30 La Solicitud de Patente de Estados Unidos 2010/0311952 divulga un método para purificar una inmunoglobulina, en donde el método comprende aplicar una solución acuosa tamponada que comprende una inmunoglobulina en forma monomérica y agregada a un material de intercambio catiónico bajo condiciones en las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une al material de intercambio catiónico, y recuperar la inmunoglobulina en forma monomérica de la solución después del contacto con el material de intercambio catiónico.

35 La Solicitud de PCT WO2010/072381 divulga un método para purificar una inmunoglobulina, en donde el método comprende aplicar una solución acuosa tamponada que comprende una inmunoglobulina en forma monomérica, agregada y fragmentada a un material de cromatografía de intercambio aniónico bajo condiciones en las que la inmunoglobulina en forma monomérica no se une al material de intercambio aniónico, y recuperar la inmunoglobulina en forma monomérica en el flujo a través del material de cromatografía de intercambio aniónico, por lo que la solución acuosa tamponada tiene un valor de pH de 8,0 a 8,5. En una realización, el material de cromatografía de intercambio aniónico es un material de cromatografía de intercambio aniónico de membrana. Jose et al. (2010) divulga que la pasteurización durante la producción intravenosa de inmunoglobulina inactiva algunos agentes trombogénicos como las enzimas de coagulación. Sin embargo, este método no inactiva selectivamente las enzimas de coagulación y por tanto puede alterar la actividad de la solución de inmunoglobulina.,

40 Por tanto, hay una necesidad de un método que elimine selectivamente el agente trombogénico de una solución de inmunoglobulina sin afectar a las inmunoglobulinas.

50 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para eliminar específicamente PKA, calicreína y/o FXI(a) de una preparación de inmunoglobulina. La invención proporciona un método para eliminar el activador de precalicreína y un agente trombogénico seleccionado de Factor XI y/o Factor XIa de una solución que contiene inmunoglobulina, el método comprendiendo los pasos de: (a) eliminar el Factor XI y/o Factor XIa poniendo en contacto la solución que contiene inmunoglobulina a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3 con un soporte que comprende grupos inmovilizados cargados negativamente para permitir la unión del Factor XI y/o Factor XIa; y recoger una fracción no unida que comprende IgG; y (b) eliminar el activador de precalicreína poniendo en contacto la solución que contiene inmunoglobulina a un pH en el intervalo de 7 a 8,2 con un soporte que comprende grupos inmovilizados cargados positivamente para permitir la unión del activador de precalicreína; y recoger una fracción no unida que comprende IgG; en donde el método emplea el paso (a) seguido del paso (b) o el paso (b) seguido del paso (a).

65 En una realización de la presente invención, la solución tiene un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o

menos de 5,0. En otra realización de la presente invención, la solución tiene un pH en el intervalo igual o mayor de 4,0 a igual o menos de 5,0. En otra realización adicional de la presente invención, la solución tiene un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 4,7. En otra realización más de la invención, la solución tiene un pH de aproximadamente 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6 o 4,7.

5 En otra realización adicional más de la invención, la solución tiene un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 4,3.

10 En otra realización de la invención, la solución tiene un pH en el intervalo de igual o más de 4,0 a igual o menos de 4,3.

En otra realización adicional de la invención, la solución tiene un pH en el intervalo de igual o más de 4,1 a igual o menos de 4,3.

15 En una realización de la presente invención, la fracción no unida I se pone en contacto adicionalmente con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados bajo el mismo pH; y se recoge una fracción II no unida.

20 En otra realización de la presente invención, el soporte está en forma de un material cromatográfico o una membrana cromatográfica.

25 En otra realización de la presente invención, el material de soporte o membrana es hidrófilo y se selecciona del grupo que consiste de agarosa, sefarosa, perlas acrílicas, celulosa, vidrio de poro controlado, geles de sílice y dextranos; hidrófobo y seleccionado del grupo que consiste de resinas; o polímero sintético orgánico seleccionado del grupo que consiste de materiales o membranas a base de poliacrilamidas o poliestirenos.

En una realización de la presente invención, los grupos cargados negativamente se inmovilizan en el soporte a través de un conector presente entre el soporte y los grupos cargados negativamente.

30 En una realización de la presente invención, el conector se selecciona del grupo que consiste de una proteína, aminoácido y péptido.

En un aspecto, el soporte se modifica químicamente.

35 En un aspecto, el soporte es un intercambiador catiónico débil o fuerte.

40 En una realización de la presente invención, los grupos cargados negativamente inmovilizados se seleccionan del grupo que consiste de derivados de ácidos sulfónicos y otros ácidos que contienen azufre, ácido fórmico y otros ácidos carboxílicos, ácido fosfórico y otros ácidos que contienen fósforo, nitrato y otros ácidos que contienen nitrógeno, y una combinación de los mismos.

En un aspecto, los grupos cargados negativamente inmovilizados son ácidos que contienen azufre como el sulfopropilo.

45 En un aspecto, los grupos cargados negativamente inmovilizados son ácidos carboxílicos como carboximetilo.

50 En un aspecto, el método comprende además los pasos de: ajustar la fracción I no unida o la fracción II no unida a un pH en el intervalo de 7 a 8,2; poner en contacto la fracción I no unida o la fracción II no unida con un soporte que comprende grupos cargados positivamente inmovilizados a un pH en el intervalo de 7 a 8,2; y recoger una fracción no unida.

55 En un aspecto, el método comprende además los pasos de ajustar y poner en contacto la solución, antes de contactar con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados, con un soporte que comprende grupos cargados positivamente inmovilizados a un pH en el intervalo de 7 a 8,2; y recoger una fracción no unida.

60 En una realización de la presente invención, los grupos cargados positivamente inmovilizados se seleccionan del grupo que consiste de amonio, alquilamónio, dialquilamónio, trialquilamónio, amonio cuaternario, grupos alquilo, H⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, grupo amino funcional, y una combinación de los mismos.

En una realización de la presente invención, los grupos cargados positivamente inmovilizados son amonio cuaternario. El amonio cuaternario puede ser dietilaminoetilo (DEAE).

65 En otra realización más de la invención, el método comprende poner en contacto la solución con el soporte

que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados a un pH en el intervalo de 7 a 8,2; recoger la fracción no unida; ajustar el pH de la fracción no unida a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3; poner en contacto la fracción no unida con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3; y recoger la fracción I no unida.

5 En otro aspecto más, el ajuste y el contacto de la fracción no unida con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados se lleva a cabo a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,0.

10 En un aspecto, el ajuste y el contacto de la fracción no unida con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados se lleva a cabo a un pH en el intervalo de igual o más de 4,0 a igual o menos de 5,0.

15 En un aspecto, el ajuste y el contacto de la fracción no unida con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados se lleva a cabo a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 4,7.

20 En un aspecto, el ajuste y el contacto de la fracción no unida con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6 o 4,7.

En un aspecto, el ajuste y el contacto de la fracción no unida con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados se lleva a cabo a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 4,3.

25 En un aspecto, el ajuste y el contacto de la fracción no unida con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados se lleva a cabo a un pH en el intervalo de igual o más de 4,0 a igual o menos de 4,3.

30 En un aspecto, el ajuste y el contacto de la fracción no unida con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados se lleva a cabo a un pH en el intervalo de igual o más de 4,1 a igual o menos de 4,3.

35 En otra realización de la presente invención, poner en contacto la solución con el soporte que comprende los grupos cargados positivamente se lleva a cabo a una velocidad lineal en el intervalo de 1 a 2 ml/min/cm², y la solución que contiene inmunoglobulina tiene una temperatura en el intervalo de 8 a 37° C.

40 En una realización de la presente invención, el método comprende además los pasos de: poner en contacto la solución antes de contactar con el soporte que comprende grupos cargados negativamente inmovilizados con un material cromatográfico que comprende polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional; y recoger una fracción III no unida.

En un aspecto, el método comprende además los pasos de: poner en contacto la fracción no unida, la fracción I no unida o la fracción II no unida con un material cromatográfico que comprende un polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional; y recoger una fracción III no unida.

45 En un aspecto, el soporte que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados es un intercambiador aniónico débil o fuerte.

50 Otro aspecto se refiere a un método para preparar una composición de inmunoglobulina que comprende los pasos de: someter una solución que contiene inmunoglobulina a por lo menos dos pasos de cromatografía negativa: una cromatografía de intercambio aniónico a un pH en el intervalo de 7 a 8,2; seguido de una cromatografía de intercambio catiónico a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3.

55 En un aspecto, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo dos veces. En una realización, las dos cromatografías de intercambio catiónico se llevan a cabo en tándem.

En una realización de la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,0.

60 En otra realización de la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo a un pH en el intervalo de igual o más de 4,0 a igual o menos de 5,0.

En otra realización adicional de la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 4,7.

65 En otra realización más de la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo

a un pH de aproximadamente 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6 o 4,7.

En otra realización adicional más de la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 4,3.

En otra realización más de la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo a un pH en el intervalo de igual o más de 4,0 a igual o menos de 4,3. En otra realización adicional más de la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo a un pH en el intervalo de igual o más de 4,1 a igual o menos de 4,3.

En una realización de la presente invención, el método comprende además una cromatografía negativa que usa un material cromatográfico que comprende polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional.

En una realización de la presente invención, el intercambiador catiónico tiene la forma de una membrana.

En una realización de la presente invención, el intercambiador catiónico comprende un grupo funcional sulfónico.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a una composición de inmunoglobulina derivada de sangre o fracciones de sangre, que comprende un 4%-10% de proteína y que se puede obtener de acuerdo con el método de la invención.

También se divulga un receptáculo que contiene la composición de inmunoglobulina de acuerdo con la invención.

También se divulga un método para tratar a un sujeto que padece una inmunodeficiencia, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, o una infección aguda, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de inmunoglobulina de acuerdo con la invención.

Descripción de las realizaciones de la invención

La invención se refiere a un método para eliminar agentes trombogénicos de una preparación de inmunoglobulina. En una realización de la invención, la preparación de inmunoglobulina se deriva de sangre o fracciones de sangre. En otra realización, la sangre o las fracciones de sangre son de más de un donante o de una pluralidad de donantes.

De acuerdo con la presente invención se descubrió que FXI y/o su forma activa FXIa se pueden eliminar eficazmente de una solución que contiene inmunoglobulina sometiendo la solución de inmunoglobulina a una cromatografía de intercambio catiónico a un nivel de pH de menos de 6. Se obtuvieron resultados óptimos en un intervalo de pH de más de 3,8 a igual o menos de 5,3. Se descubrió que este intervalo de pH elimina eficazmente FXIa y al mismo tiempo preserva sustancialmente los niveles de inmunoglobulina (IgG).

Estos descubrimientos son sorprendentes, en vista de que la inmunoglobulina (que tiene un punto isoeléctrico de 6-8 Patentes de Estados Unidos 6592905 y 4296027) tiene una carga eléctrica neta positiva a un nivel de pH de menos de 6 y, como tal, se esperaba que también se uniera al intercambiador catiónico, lo que da como resultado que permanezcan niveles de inmunoglobulina bajos en la solución (Patente de Estados Unidos 6592905)

Sin estar limitado por el mecanismo, parece que a un pH inferior a 6, FXIa y la inmunoglobulina compiten por los grupos cargados negativamente en el intercambiador catiónico y la unión de FXIa es más favorable.

También, de acuerdo con la presente invención, se descubrió sorprendentemente que se puede lograr una mayor eficacia de eliminación de FXIa de la solución que contiene inmunoglobulina sometiendo la solución de inmunoglobulina al intercambiador catiónico a un intervalo de pH de 4,0 a 4,3. Estos descubrimientos también son sorprendentes debido al hecho de que FXIa tiene una carga neta positiva en un amplio intervalo de pH y hasta aproximadamente pH 9 (su punto isoeléctrico es 8,9-9,1; Haematologic Technologies Inc. Research Reagent Catalog). Sorprendentemente, estos resultados se obtuvieron con un intercambiador catiónico débil o con un intercambiador catiónico fuerte.

También se descubrió de acuerdo con la presente invención que la calicreína (que tiene un punto isoeléctrico de 8,6-9,5) puede eliminarse eficazmente de una solución que contiene inmunoglobulina sometiendo la solución a una cromatografía de intercambio catiónico a un nivel de pH de 4,1-4,3 a la vez que se conservan sustancialmente los niveles de IgG. Estos descubrimientos son sorprendentes a la luz de que la inmunoglobulina tiene una carga eléctrica neta positiva en este intervalo de pH y, por tanto, se esperaba que se uniera al intercambiador catiónico así como que diese como resultado niveles bajos de inmunoglobulina restantes en la

solución.

Los resultados muestran la eliminación máxima de un agente trombogénico de una solución que contiene IgG, sometiendo la solución a un intercambiador catiónico bajo un intervalo de pH muy estrecho, mientras se mantiene un nivel inalterado de inmunoglobulina en la solución.

Estos descubrimientos allanaron el camino para el desarrollo de un método para eliminar un agente trombogénico de una solución que contiene inmunoglobulina mientras se preserva la mayoría de la inmunoglobulina dentro de la solución y/o sin alterar la distribución de subclases de IgG (por ejemplo, IgG1- aproximadamente 65%, IgG2- aproximadamente 30%, IgG3- aproximadamente 6% e IgG4- aproximadamente 1%). Por "preservar la mayoría de la inmunoglobulina dentro de la solución" se entiende que el método permite una recuperación de igual o más del 75% de la inmunoglobulina en comparación con el contenido de inmunoglobulina inicial antes de poner en contacto la solución con el soporte de acuerdo con la invención. En una realización, el método permite una recuperación del 80%, 85%, 90%, 95% y el 99% de la inmunoglobulina en comparación con el contenido de inmunoglobulina inicial antes de poner en contacto la solución con el soporte de acuerdo con la invención.

La invención proporciona un método para eliminar un agente trombogénico de una solución que contiene inmunoglobulina, el método comprendiendo los pasos de: proporcionar la solución de inmunoglobulina a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3; proporcionar un soporte que comprende grupos cargados negativamente inmovilizados; poner en contacto la solución con el soporte; y recoger una fracción no unida. En una realización de la invención, la solución tiene un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,0. En otra realización de la invención, el intervalo es de igual o más de 4,0 a igual o menos de 5,0. En una realización adicional, el intervalo es de más de 3,8 a igual o menos de 4,7, como un pH de aproximadamente 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6 o 4,7. Además, en una realización adicional, el intervalo es de más de 3,8 a igual o menos de 4,3. Además, en una realización adicional, el intervalo es igual o más de 4,0 a igual o menos de 5,3. En otra realización adicional, el intervalo es muy estrecho, igual o más de 4,0 a igual o menos de 4,3 o de aproximadamente 4,1 a aproximadamente 4,3 y específicamente permite la eliminación de FXIa y calicreína.

El término "agente trombogénico" se refiere a un agente que tiene el potencial de inducir la formación de coágulos de fibrina. El término "agente trombogénico" se usa en la presente de manera intercambiable con los términos agente hemostático, trombótico y procoagulante. El agente trombogénico puede ser, por ejemplo, calicreína, FXI, FXIa, Factor XII, trombina y PKA. El término "agente trombogénico" incluye agentes inducidos trombogénicos y "agentes generadores de trombosis" como agentes que activan factores trombogénicos en la cascada de coagulación.

El término "soporte" como se usa en la presente incluye un portador, o cualquier matriz usada para unir, inmovilizar, transportar o estabilizar los grupos cargados negativamente. Los soportes son bien conocidos en la técnica como se describe en Hermanson et al. Immobilized Affinity Ligand Techniques (Academic Press Inc. 1992). El soporte para llevar a cabo el método de la invención puede estar hecho de cualquier material que sea capaz de unirse a una molécula que comprenda grupos cargados negativamente. Los soportes sólidos incluyen, pero no están limitados a, matrices, columnas, cubreobjetos, materiales cromatográficos, filtros, portaobjetos de microscopio, tubos de ensayo, viales, botellas, soportes ELISA, superficies de vidrio o plástico, membranas cromatográficas, láminas, partículas, perlas, incluyendo las perlas magnéticas, geles, polvos, fibras y similares.

En una realización de la invención, el soporte está en forma de un material cromatográfico.

En otra realización de la invención, el soporte está en forma de una membrana cromatográfica. El soporte puede estar compuesto de un material hidrófilo como agarosa, sefariosa, perlas acrílicas, celulosa, vidrio de poro controlado, geles de sílice, dextranos; material hidrófobo como resinas; o un polímero artificial/sintético orgánico como materiales a base de poli(acrilamidas o poliestirenos). Los materiales/polímeros típicos están disponibles comercialmente con los nombres comerciales Sephacryl® (Pharmacia, Suecia), Ultragel® (Biosepara, Francia) TSK-Gel Toyopearl® (Toso Corp., Japón), HEMA (Alltech Ass. (Deer-field, Ill), USA), Eupergit® (Rohm Pharma, Darmstadt, Alemania). También materiales a base de azlactonas (3M, St. Paul, Minn., USA). Se prefieren especialmente Agarose® o Sepharose®. Estos materiales están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Sigma, St. Louis. El material cromatográfico puede suspenderse en un medio apropiado y la lechada resultante puede usarse, por ejemplo, en una columna cromatográfica. Sin embargo, el método de la invención también puede llevarse a cabo por lotes, por ejemplo, usando un tubo de ensayo o un reactor discontinuo. En una realización de la invención, el soporte es un FRACTOGEL® EMD, un TOYOPEARL®, o una matriz de polímero TSK-GEL®. La cromatografía en columna es conocida en la técnica (Practical Protein Chromatography editado por Kenney y Fowell, Volumen 11 Humana Press, 1992) y generalmente se refiere a una técnica en la que se permite que una solución (la fase móvil) descienda por una columna y un componente individual sea adsorbido por la fase estacionaria, por ejemplo por el material cromatográfico. El término "grupos cargados negativamente" se refiere a una molécula que comprende grupos químicos que llevan una carga negativa, como derivados de ácido sulfónico y otros ácidos que contienen azufre (por ejemplo, SO₄²⁻ y SO₃⁻), ácido fórmico y otros ácidos carboxílicos (por ejemplo, COO⁻), así como ácido fosfórico y otros ácidos que contienen fósforo (por ejemplo, PO₄³⁻), nitrato y otros ácidos que contienen

5 nitrógeno (por ejemplo, NO²) y combinaciones de los mismos. En una realización de la invención, los grupos cargados negativamente son ácidos que contienen azufre. En otra realización de la invención, los grupos cargados negativamente son sulfopropilo (SP). En otra realización adicional de la invención, los grupos cargados negativamente son ácidos carboxílicos. En otra realización de la invención, los grupos cargados negativamente son carboximetilo (CM).

10 El soporte puede tener una superficie hidrófoba o hidrófila que se une a una parte de los grupos cargados negativamente mediante interacción covalente hidrófoba/hidrófila. La superficie hidrófoba/hidrófila del soporte también puede ser un polímero como plástico o cualquier otro polímero en el que se hayan enlazado grupos hidrófobos/hidrófilos como polietileno, poliestireno o polivinilo. Alternativamente, los grupos cargados negativamente pueden unirse covalentemente al soporte mediante un puente de conector entre el soporte y los grupos cargados negativamente. El término "conector" como se usa anteriormente se refiere a un brazo espaciador o una correa que tiene un peso molecular de decenas a millones de Daltons que se usa como un conector intermedio entre el soporte y los grupos cargados negativamente. Por ejemplo, el conector puede ser una proteína, un péptido y/o un aminoácido. En el caso de que el soporte se una directamente a la molécula que comprende los grupos cargados negativamente (sin un conector) puede usarse un grupo reactivo dentro de la molécula que comprende los grupos cargados negativamente, como un grupo hidroxilo, un éster o un grupo amino o un grupo carboxi para unirlo a un grupo reactivo presente en el soporte para crear el enlace covalente. El soporte también puede tener una superficie cargada o puede modificarse para transportar un grupo cargado que interactúa con los grupos cargados negativamente. El soporte puede tener otros grupos reactivos que pueden activarse químicamente para unir los grupos cargados negativamente, por ejemplo, matrices activadas con bromuro de cianógeno, matrices activadas con epoxi y similares. El soporte también puede comprender un portador inorgánico como material de óxido de silicio, por ejemplo, gel de sílice, al que se pueden enlazar covalentemente los grupos cargados. En otra realización, los grupos cargados se unen a una superficie de membrana o se incorporan en la membrana. La unión de los grupos cargados a la membrana puede llevarse a cabo de la misma manera que se describe anteriormente.

25 El intercambiador catiónico usado de acuerdo con la invención puede estar en forma de una membrana o en forma de un material cromatográfico como se ha definido anteriormente.

30 El soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados es referido generalmente como intercambiador catiónico. Los "intercambiadores catiónicos" reciben su nombre por su capacidad para atraer o unir cationes o partículas cargadas positivamente. Típicamente, el sistema de soporte está cargado negativamente y una molécula se unirá a un pH que hace que la carga neta de la molécula sea positiva. Ejemplos de intercambiadores catiónicos disponibles comercialmente en forma de membrana son la membrana Mustang® S y la cápsula Mustang® S que comprenden un grupo funcional sulfónico.

35 En el caso de usar una membrana como soporte (por ejemplo, la membrana Mustang® S, la cápsula Mustang® S), la solución de inmunoglobulina puede ponerse en contacto con la membrana a un caudal de fluido en el intervalo de 2 a 4,3 Volumen de membrana (MV)/min. El término "caudal de fluido" se refiere normalmente al flujo de la solución a través del soporte.

40 El término "punto isoeléctrico" se refiere al pH en el que una molécula no lleva carga neta. Por debajo del punto isoeléctrico, la molécula lleva una carga positiva neta, por encima la molécula lleva una carga negativa neta.

45 El soporte que comprende los grupos cargados negativamente puede ser un intercambiador catiónico débil (por ejemplo, columna de carboximetilo (CM)) o uno fuerte (por ejemplo, membrana Mustang® S). Un intercambiador catiónico débil generalmente se refiere a un intercambiador que está compuesto de un ácido débil que pierde gradualmente su carga a medida que disminuye el pH, mientras que un intercambiador catiónico fuerte se refiere generalmente a un intercambiador que está compuesto de un ácido fuerte que puede sostener su carga sobre un intervalo de pH amplio.

50 El término "poner en contacto" se refiere a cualquier tipo de acción de combinación que pone la solución o fracción en contacto suficientemente cercano con el soporte y más particularmente con los grupos cargados del soporte de una manera que se produzca una interacción de unión entre los grupos cargados y cualquier compañero de unión, por ejemplo, un agente trombogénico, presente en la solución/fracción. La solución/fracción puede incubarse con el soporte durante un período de tiempo suficiente que permite la unión entre los grupos cargados y el agente trombogénico. La solución/fracción puede estar a una temperatura en el intervalo de 7° C a 37° C mientras se pone en contacto con el soporte.

55 De acuerdo con la presente invención, se descubrió que llevar a cabo un segundo paso de cromatografía de intercambio catiónico dio como resultado una mayor eliminación de FXIa de la solución que contiene inmunoglobulina en comparación con la realización de un solo paso de cromatografía de intercambio catiónico. Este segundo paso de cromatografía de intercambio catiónico se llevó a cabo mientras se preservaban sustancialmente los niveles de IgG. Por tanto, la solución puede ponerse en contacto con el soporte varias veces. Alternativamente, cuando el soporte es un filtro, pueden combinarse más de un filtro en una sola unidad funcional. En una realización

de la invención, el primer paso de filtración da como resultado una fracción I no unida que se pone en contacto con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados bajo el mismo intervalo de pH especificado anteriormente, y se recoge una segunda fracción II no unida.

5 El soporte puede equilibrarse antes de poner en contacto la solución/fracción con un tampón, por ejemplo lavando el soporte con el tampón de la solución que contiene inmunoglobulina.

10 El término "equilibrar" se refiere generalmente a permitir que la columna o el soporte alcancen una condición de tampón específica como un nivel de pH específico y/o fuerza iónica.

15 El término "fracción no unida" se refiere típicamente al flujo a través del material obtenido o recogido después de poner en contacto la solución que contiene inmunoglobulina con un soporte que comprende grupos cargados o al flujo a través del material que se obtiene o recoge después de poner en contacto una solución/fracción que contiene inmunoglobulina con un soporte de cromatografía.

20 En una realización, los grupos cargados están cargados negativamente. En otra realización, el flujo a través del material obtenido se denomina "fracción I no unida". En otra realización, la "fracción I no unida" se somete al soporte que comprende los grupos cargados negativamente, y el flujo a través del material se denomina "fracción II no unida".

25 Puede prepararse una columna cromatográfica compactando un material cromatográfico seco o un material hinchado previamente en una columna. El material cromatográfico seco puede tratarse previamente agitando el material en 2 volúmenes de HCl 0,5 N (para obtener un soporte que comprende grupos cargados negativamente) o en NaOH 0,5 N (para obtener un soporte que comprende grupos cargados positivamente). El material se puede dejar sedimentar, por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos. El sobrenadante puede decantarse y el material puede lavarse con H₂O hasta que se alcance un valor de pH de 4 u 8, respectivamente. El material puede suspenderse luego en 2 volúmenes de NaOH 0,5 N (para un soporte que comprende grupos cargados negativamente) o en HCl 0,5 N (para un soporte que comprende grupos cargados positivamente), y el sobrenadante puede decantarse, por ejemplo, después de 30 min. El segundo paso suspensión puede repetirse, y la columna puede lavarse luego con H₂O hasta que el filtrado sea neutro.

35 Un material hinchado previamente (y el material seco tratado como se describe en el párrafo anterior) puede pretratarse agitando el material durante, por ejemplo, 5 minutos con el tampón usado para cargar la solución que contiene inmunoglobulina en una proporción de 6 ml de tampón/gramo material hinchado previamente (o 30 ml de tampón/gramo de material seco). El pH puede ajustarse luego de acuerdo con la invención, y el material se deja sedimentar, por ejemplo, durante aproximadamente 30 minutos, y se decanta el sobrenadante. La lechada se vuelve a dispersar luego en tampón de equilibrio (proporción como antes). Para la compactación de la columna, el material se deja sedimentar.

40 Alternativamente, puede usarse una columna lista para usar precompactada disponible comercialmente sin ningún pretratamiento.

45 Posteriormente, la columna (preparada a partir del material seco, material previamente hinchado, o la columna lista para usar precompactada) se compacta y se equilibra a las condiciones de pH deseadas (por ejemplo, usando tampón de equilibrio).

50 Después de equilibrar la columna, se carga la solución de inmunoglobulina que tiene el pH deseado y la columna puede lavarse con aproximadamente cinco volúmenes de lecho de tampón de equilibrio para lavar todo el material no unido. La columna se puede limpiar para un segundo uso.

55 La preparación y el pretratamiento del material cromatográfico, la compactación de la columna, el equilibrio de la columna, la carga de la solución que contiene inmunoglobulina, la recogida del material no unido, y la limpieza de la columna para un segundo uso son bien conocidos en la técnica, ver, por ejemplo, P Protein liquid chromatography, editado por Michael Kastner, Elsevier science B.V. 2000, páginas 45-49.

60 La solución que contiene inmunoglobulina puede someterse a un paso de filtración antes de la cromatografía para reducir los agregados en la solución. La filtración puede llevarse a cabo, por ejemplo, a través de un filtro de 1,2 µm de profundidad o un filtro de 0,2 µm. En una realización de la invención, antes de llevar a cabo la cromatografía de intercambio aniónico, la solución se somete a un filtro de profundidad cargado positivamente de 0,2 µm. Ventajosamente, el filtro de profundidad cargado positivamente se usa para eliminar materiales de carga negativa como fosfolípidos, lípidos y similares. Puede realizarse una cromatografía de intercambio aniónico usando 7,5 l de resina, por ejemplo, resina de dietilaminoetil (DEAE) compactada en una columna, por ejemplo, que tiene un diámetro de 35 cm y una altura de lecho de 15 cm. La columna compactada puede equilibrarse con por lo menos 48 volúmenes de columna de agua purificada (PuW) o agua para inyección (WFI) a un caudal de fluido de 100-120 l/hora, por ejemplo, a un caudal de fluido de 110 l/hora. Después del equilibrio, se puede cargar en la columna un

volumen de 18 columnas de solución que contiene inmunoglobulina. La carga de la solución que contiene inmunoglobulina puede llevarse a cabo a un caudal de fluido de 50-70 l/hora, por ejemplo, a un caudal de fluido de 60 l/hora. La solución puede estar a una temperatura de 2-10° C, por ejemplo, a 8-10° C. La cromatografía puede llevarse a cabo a temperatura ambiente (22 ± 2° C).

Una cromatografía de intercambio catiónico puede llevarse a cabo usando una membrana de filtro de intercambio catiónico que tiene un volumen de membrana de 1560 ml. Pueden usarse varias combinaciones de tamaños de membrana para obtener un volumen final de membrana de 1560 ml, por ejemplo, pueden conectarse en tándem dos membranas de filtro que tienen un volumen de 780 ml para formar un volumen total de membrana de 1560 ml.

El intercambiador catiónico puede preacondicionarse con por lo menos 38 volúmenes de membrana de NaOH 1N seguido de por lo menos 64 volúmenes de membrana de NaCl 1N a un caudal de fluido de 1,6-2,3 l/min. El término "preacondicionamiento" se refiere generalmente a lavar el soporte o la membrana antes de su uso para eliminar las sustancias no deseadas que puedan estar presentes en la superficie del soporte o la membrana. Posteriormente, la membrana del filtro puede equilibrarse con por lo menos 64 volúmenes de membrana de acetato de sodio 20 mM (ajustado al pH deseado) a un caudal de fluido de 1,6-2,3 l/min hasta alcanzar el pH deseado. Después del equilibrio, pueden filtrarse por lo menos 50-140 volúmenes de membrana de solución que contiene inmunoglobulina a través de la membrana del filtro. La cromatografía puede llevarse a cabo a temperatura ambiente (22 ± 2° C) a un caudal de fluido de 1,6-2,3 l/min. La temperatura de la solución cargada puede ser de 6-10° C.

La concentración de proteína en la solución que contiene inmunoglobulina puede estar en el intervalo de 40 a 75 mg/ml durante la carga en los intercambiadores catiónicos o aniónicos, por ejemplo, una concentración de proteína de 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 mg/ml.

En el caso de la cromatografía en columna, se puede obtener una fracción no unida después del lavado de la columna cargada con el mismo tampón usado para el equilibrio y/o el tampón usado para la carga (a menudo referido "tampón de unión") de la solución que contiene inmunoglobulina en la columna.

También se descubrió de acuerdo con la presente invención que la cromatografía de afinidad de benzamidina sefarosa (que une por afinidad serina proteasas como FXIa) no era adecuada para eliminar FXIa de una solución que contiene inmunoglobulina. Sin embargo, se descubrió sorprendentemente que FXIa puede eliminarse eficazmente de una solución de inmunoglobulina sometiendo la solución de inmunoglobulina a cromatografía de afinidad de heparina a un nivel de pH bajo (por ejemplo, un nivel de pH de 5,3).

Sin estar limitado por el mecanismo, parece que a niveles bajos de pH la cromatografía de afinidad de heparina actúa como un intercambiador catiónico (que tiene grupos ácidos como COOH y H₂SO₄) y por tanto puede usarse ventajosamente para eliminar eficazmente FXIa de una solución que contiene inmunoglobulina de acuerdo con la invención.

La "cromatografía de afinidad" se basa generalmente en una interacción biológica altamente específica como la que existe entre antígeno y anticuerpo, enzima y sustrato, o receptor y ligando.

En una realización de la invención, una eliminación de FXIa de más del 75%, por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95% y 99% de la solución o fracción que contiene inmunoglobulina en comparación con el contenido inicial de FXIa (antes de poner en contacto la solución o la fracción con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados de acuerdo con la invención) se considera eficiente.

En una realización de la invención, una eliminación de calicreína de más del 75%, por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% y 99% de la solución o fracción que contiene inmunoglobulina en comparación con el contenido inicial de calicreína (antes de poner en contacto la solución o la fracción con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados de acuerdo con la invención) se considera eficiente.

PKA tiene una carga eléctrica neta cero a un nivel de pH en el intervalo de 7-8,2 (el punto isoelectrico de PKA es de aproximadamente 8; <http://www.expasy.org>) y, como tal, no se espera que se una a grupos cargados positivamente. Aun así, de acuerdo con la presente invención, se descubrió que sometiendo una solución de inmunoglobulina con un nivel de pH en el intervalo de 7-8,2 a un intercambiador aniónico dio como resultado una eliminación eficaz de PKA. Los resultados también muestran que el uso de un intervalo de nivel de pH de 7-8,2 en una cromatografía de intercambio aniónico también dio como resultado altas recuperaciones de IgG en la fracción no unida. Un pH de 7-8,2 es un nivel en el que la IgG tiene una carga neta cero o negativa y, por tanto, se esperaba que parte de ella se perdiera debido a la unión con el intercambiador aniónico. Sorprendentemente se descubrió que someter una solución que contiene inmunoglobulina a un intercambiador aniónico a un intervalo de nivel de pH de 7-8,2 dio como resultado la eliminación máxima de PKA y prácticamente sin pérdida de IgG.

Por consiguiente, para eliminar la PKA y al mismo tiempo obtener una recuperación de inmunoglobulina

alta, el método de acuerdo con la invención puede comprender además un paso de poner en contacto la solución/fracción que contiene inmunoglobulina con un soporte que comprende grupos cargados positivamente inmovilizados a un pH en el intervalo de 7 a 8,2, y recoger la fracción no unida. Por tanto, la solución que contiene inmunoglobulina se somete a un intercambiador aniónico a un pH en el intervalo de 7 a 8,2.

5 En una realización, el método emplea primero el paso del intercambiador aniónico seguido del paso del intercambiador catiónico de la invención. En otra realización, el método emplea primero el paso del intercambiador catiónico seguido del paso del intercambiador aniónico.

10 En una realización, el pH de la solución que contiene inmunoglobulina se ajusta con una solución ácida o básica a un pH en el intervalo de 7 a 8,2 y la solución se pone en contacto con los grupos cargados positivamente pre-equilibrados con un tampón o PuW que tiene el mismo pH que la solución y se recoge la fracción no unida. El pH de la fracción recogida puede ajustarse con una solución ácida a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3 y la fracción puede ponerse en contacto con los grupos cargados negativamente pre-equilibrados con un tampón que tenga el mismo pH que la fracción y se recoge la fracción no unida.

15 En otra realización, el pH de la solución que contiene inmunoglobulina se ajusta con una solución ácida o básica a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3 y se pone en contacto con los grupos cargados negativamente pre-equilibrados con un tampón que tiene el mismo pH que la solución y se recoge la fracción no unida. El pH de la fracción recogida puede ajustarse con una solución básica a un pH en el intervalo de 7 a 8,2 y ponerse en contacto con los grupos cargados positivamente pre-equilibrados con un tampón o PuW que tiene el mismo pH que la fracción y se recoge la fracción no unida.

20 En una realización de la invención, los pasos del intercambiador aniónico y catiónico son uno inmediatamente después del otro. En otra realización de la invención, hay pasos adicionales entre los pasos de intercambiador aniónico y catiónico de la invención.

25 Los pasos del intercambiador aniónico o catiónico pueden realizarse varias veces para aumentar la purificación.

30 El término "grupos cargados positivamente" como se usa en la presente se refiere a una molécula que comprende grupos químicos que llevan una carga positiva como amonio, alquilamonio, dialquilamonio, trialquilamonio, amonio cuaternario [por ejemplo, dietilaminoetilo (DEAE), un dimetilaminoetilo o un trimetilaminoetilo], grupos alquilo, H⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, grupo funcional amino (por ejemplo, NR₂H⁺), y combinaciones de los mismos.

35 En una realización de la invención, los grupos cargados positivamente son amonio cuaternario (Q). En otra realización de la invención, los grupos cargados positivamente son dietilaminoetilo (DEAE).

40 En una realización de la invención, la solución que contiene inmunoglobulina se pone en contacto primero con el soporte que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados a un pH en el intervalo de 7 a 8,2, se recoge la fracción no unida; luego la fracción no unida se pone en contacto con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados; y se recoge una fracción I no unida. Alternativamente, la solución que contiene inmunoglobulina puede ponerse en contacto primero con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados; se recoge una "fracción I no unida"; y luego la fracción I no unida se pone en contacto con el soporte que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados y se recoge una "fracción no unida".

45 El soporte que comprende los grupos cargados positivamente puede estar compuesto de cualquier material que sea capaz de unirse a una molécula que comprenda grupos químicos que lleven una carga positiva como se ha definido anteriormente.

50 El soporte que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados es referido generalmente como intercambiador aniónico. Los "intercambiadores aniónicos" reciben su nombre por su capacidad de atraer o unir aniones o partículas cargadas negativamente. Los intercambiadores aniónicos son bien conocidos en la técnica (Practical Protein Chromatography editado por Kenney y Fowell Volumen 11 Humana Press, 1992). En los intercambiadores aniónicos, el sistema de soporte está cargado positivamente y una molécula se unirá si el pH del tampón es más alto que el punto isoeléctrico único de la proteína.

55 El soporte que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados puede ser un intercambiador aniónico débil o fuerte. Un intercambiador aniónico débil se refiere generalmente a un intercambiador que está compuesto por un ácido débil que pierde gradualmente su carga a medida que disminuye el pH, mientras que un intercambiador aniónico fuerte se refiere generalmente a un intercambiador que está compuesto por un ácido fuerte que puede mantener su carga sobre un amplio intervalo de pH.

60 La solución/fracción puede estar a una temperatura en el intervalo de 8 a 37° C mientras se pone en

65

contacto con el soporte.

La solución/fracción que contiene inmunoglobulina puede ponerse en contacto con el soporte varias veces y/o pueden usarse dos o más filtros combinados en una sola unidad funcional.

El soporte puede equilibrarse antes de poner en contacto la solución o fracción con el soporte, por ejemplo, lavando el soporte con el tampón de la solución/fracción que contiene inmunoglobulina.

Más específicamente, después de poner en contacto la solución con el soporte que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados, se recoge la fracción no unida (el flujo a través del material obtenido después de poner en contacto la solución de inmunoglobulina con el soporte). En el caso de la cromatografía en columna, la fracción no unida puede obtenerse después del lavado de la columna cargada con el mismo tampón usado para el equilibrio y/o el tampón usado para cargar la solución/fracción que contiene inmunoglobulina en la columna.

Las posibilidades alternativas de inmovilización entre el soporte y los grupos cargados positivamente se detallan anteriormente para las posibilidades de inmovilización entre el soporte y los grupos cargados negativamente.

En el caso de usar una columna como el soporte que comprende los grupos cargados positivamente, la solución que contiene inmunoglobulina puede ponerse en contacto con la columna a una velocidad lineal de entre 1 y 2 ml/min/cm². El término "velocidad lineal de filtración" se refiere a la velocidad de una solución que fluye a través de una columna.

La invención también proporciona un método para eliminar un agente trombogénico de una solución que contiene inmunoglobulina que comprende los pasos de: proporcionar la solución que contiene inmunoglobulina a un pH en el intervalo de 7 a 8,2, proporcionar un soporte que comprende grupos cargados positivamente inmovilizados y, proporcionar un soporte que comprende grupos cargados negativamente inmovilizados; poner en contacto la solución con el soporte que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados; recoger la fracción no unida; ajustar el pH de la fracción a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3; poner en contacto la fracción no unida con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados; y recoger una fracción I no unida.

En una realización de la invención, las cantidades detectables de agentes generadores de trombosis (por ejemplo, PKA, calicreína y/o FXIa) se eliminan de la solución que contiene inmunoglobulina.

El término "detectable" se refiere, por ejemplo, a un nivel detectado usando un método de análisis como se describe a continuación en la sección Materiales y Métodos.

En una realización de la invención, una eliminación de PKA de más del 80%, por ejemplo, 83%, 85%, 90%, 95% y 99% de la solución o fracción que contiene inmunoglobulina en comparación con el contenido inicial de PKA (antes de poner en contacto la solución o la fracción con el soporte que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados de acuerdo con la invención) se considera eficiente. Los descubrimientos de acuerdo con la invención también muestran que el uso de una columna SDR hecha de un polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional dio como resultado la eliminación de cantidades residuales de FXIa. Una columna SDR es una técnica cromatográfica en la que la muestra interactúa, a una concentración de sal de fase móvil relativamente alta, con una fase estacionaria hidrófoba.

Por consiguiente, la solución que contiene inmunoglobulina también puede ponerse en contacto con un material cromatográfico que comprende polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional, y luego se recoge una fracción no unida (por ejemplo, "fracción III no unida"). Alternativamente, la puesta en contacto con el material cromatográfico que comprende el polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional puede llevarse a cabo después de poner en contacto con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados o después de poner en contacto con el soporte que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados, es decir, "la fracción no unida", la "fracción I no unida" o la "fracción II no unida" se ponen en contacto con el material cromatográfico que comprende el polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional, y luego se recoge una fracción III no unida. Un ejemplo de dicho polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional es la resina HyperD suministrada por Biosepra. La cromatografía HyperD implica un modo mixto de adsorción de interacción hidrófoba y exclusión molecular [Guerrier L et al. "Specific sorbent to remove solvent-detergent mixtures from virus-inactivated biological fluids". J Chromatogr B Biomed Appl. 3 de febrero de 1995; 664(1):119-125].

Se observó (usando el modelo animal de Wessler como se describe en Wessler et al. Biologic assay of a thrombosis-inducing activity in human serum. J Appl Physiol. 1959;14:943-946) que una composición de inmunoglobulina sometida a eliminación de calicreína, PKA y/o FXIa de acuerdo con la invención mostró una actividad inductora de trombosis reducida.

En una realización, la invención proporciona un método para purificar una solución que contiene inmunoglobulina de agentes trombogénicos que comprende: someter la solución a por lo menos dos pasos de cromatografía iónica negativa: una cromatografía de intercambio aniónico a un pH en el intervalo de 7 a 8,2; seguido de una cromatografía de intercambio catiónico a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3. El método puede comprender además el paso de someter la solución a cromatografía hidrófoba negativa usando un material cromatográfico que comprende polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional.

La invención también proporciona un método para preparar una composición de inmunoglobulina que comprende los pasos de: someter una solución que contiene inmunoglobulina a por lo menos dos pasos de cromatografía iónica negativa: una cromatografía de intercambio aniónico a un pH en el intervalo de 7 a 8,2; seguido de una cromatografía de intercambio catiónico a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3.

La cromatografía de intercambio catiónico puede llevarse a cabo a un intervalo de pH de más de 3,8 a igual o menos de 5,0, a un intervalo de pH de igual o más de 4,0 a igual o menos de 5,0, a un intervalo de pH de más de 3,8 a igual o menos de 4,7, en un intervalo de pH de más de 3,8 a igual o menos de 4,3, o en un intervalo de pH de igual o más de 4,0 a igual o menos de 4,3.

Los métodos de la invención pueden comprender además una cromatografía hidrófoba negativa usando un material cromatográfico que comprende polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional.

En ciertas realizaciones, el flujo a través del material desde el intercambiador catiónico de acuerdo con la invención se denomina fracción I no unida; el flujo a través del material desde el intercambiador aniónico de acuerdo con la invención se denomina fracción no unida; el flujo a través del material de un segundo paso del intercambiador catiónico de acuerdo con la invención se denomina fracción II no unida; y el flujo a través de un material cromatográfico que comprende polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional de acuerdo con la invención se denomina fracción III no unida. Cada una de estas fracciones puede cargarse en uno o más de los pasos y condiciones cromatográficos de acuerdo con la invención en un orden diferente para eliminar los agentes trombogénicos y para recoger el flujo que contiene inmunoglobulina a través de la fracción.

En una realización de la invención, una solución que contiene inmunoglobulina se carga en el polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.468.733. La fracción III no unida resultante se recoge, el pH de la fracción III no unida se equilibra a 7-8,2, y la fracción III se somete a un intercambiador aniónico bajo condiciones de pH similares. La fracción no unida se recoge, el pH de la fracción no unida se equilibra de acuerdo con la invención antes de cargarla en un intercambiador catiónico de acuerdo con la invención, y se recoge la fracción no unida I. Este último paso puede repetirse.

El término "cromatografía negativa" se refiere a las condiciones elegidas de tal manera que solo una proporción relativamente pequeña (por ejemplo, menos del 25%) o ninguna de una proteína purificada (es decir, inmunoglobulina) se una al soporte de la cromatografía y, por tanto, pase a través del soporte en la separación cromatográfica. La parte predominante de la proteína está presente en el flujo a través del material.

El término "cromatografía positiva" se refiere a las condiciones elegidas de tal manera que la mayoría de una proteína purificada (es decir, inmunoglobulina) se una al soporte de la cromatografía y, por lo tanto, se requiere un paso de elución en condiciones no isocráticas para recuperar la proteína.

Los resultados muestran que también se obtuvo una eliminación eficiente de los agentes trombogénicos en el proceso de aumento progresivo de la cromatografía de intercambio catiónico y aniónico.

La invención también proporciona una composición de inmunoglobulina que comprende niveles bajos de un agente trombogénico. La inmunoglobulina puede proporcionarse en forma líquida o sólida, por ejemplo, como un polvo liofilizado.

En una realización de la invención, la solución que contiene inmunoglobulina se pone primero en contacto con el soporte que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados (intercambiador aniónico); la fracción no unida resultante se recoge y se pone en contacto con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados (intercambiador catiónico) y se recoge la fracción I no unida resultante que comprende la composición de inmunoglobulina con agentes poco trombogénicos. En una realización de la invención, la solución que contiene inmunoglobulina también se pone en contacto con un material cromatográfico que comprende polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional (cromatografía hidrófoba-HIC).

Una composición de inmunoglobulina con niveles bajos de un agente trombogénico se refiere, por ejemplo, a una composición que tiene menos de 6 UI/ml de PKA; a una composición que muestra una generación de trombina de menos de aproximadamente 100 nM cuando se determina la formación de trombina en la composición de inmunoglobulina, por ejemplo, llevando a cabo un ensayo de generación de trombina como se describe a continuación; menos de 0,8 ng/ml de FXIa; y/o menos de 200 ng/ml de caliceína (por ejemplo, menos de 126 ng/ml).

Los niveles de PKA, calicreína y FXIa pueden determinarse realizando un ensayo como se describe a continuación en la sección Materiales y Métodos.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición de inmunoglobulina obtenible de acuerdo con el método de la invención. La composición de inmunoglobulina puede proporcionarse en un receptáculo. El vial o la jeringuilla precargada puede contener diferentes volúmenes de la composición, por ejemplo, la composición puede tener un volumen de 0,5 ml, 2 ml, 10 ml, 30 ml, 50 ml, 100 ml, 200 ml, 500 ml, 1 litro, 2 litros y 3 litros.

10 El término "receptáculo" se refiere a cualquier recipiente diseñado para contener la composición de inmunoglobulina.

15 La composición de inmunoglobulina puede comprender una concentración de proteínas en el intervalo del 2 al 20% p/v, o 5-10%. En una realización de la invención, la composición tiene una concentración de proteínas en el intervalo del 4,5-5,5% p/v. En otra realización de la invención, la composición tiene una concentración de proteínas de aproximadamente el 5% p/v. En otra realización, la composición tiene una concentración de proteínas de aproximadamente el 10% p/v. En una realización, la concentración de proteínas es de aproximadamente 50 mg/ml. El % de inmunoglobulina del contenido de proteínas total puede ser superior al 90%. En una realización de la invención, el porcentaje de inmunoglobulina del contenido total de proteínas es del 95%.

20 En otra realización de la invención, la composición de inmunoglobulina comprende un porcentaje bajo de agregados de proteínas, por ejemplo, menos del 3% de agregados de proteínas.

25 El término "agregados" se refiere a un trozo de material que contiene sólidos como agregados de proteínas. Los agregados se pueden medir por HPLC.

30 En una realización de la invención, la composición se proporciona en un volumen de 50 ml y tiene un contenido de proteínas de 2,5 g. En otra realización de la invención, la composición se proporciona en un volumen de 100 ml y tiene un contenido de proteínas de 5,0 g. En otra realización de la invención, la composición se proporciona en un volumen de 200 ml y tiene un contenido de proteínas de 10,0 g.

Los viales que comprenden la composición pueden almacenarse a una temperatura de menos de 25° C, como a una temperatura de 0° C o de 2° C a 8° C y protegerse de la luz hasta su uso.

35 La composición de inmunoglobulina también puede comprender excipientes. Como se usa en la presente, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte que se añade a la composición farmacéutica. Los excipientes pueden añadirse a la composición, por ejemplo, para asegurar que el ingrediente activo conserve su estabilidad química y actividad biológica durante el almacenamiento, para ayudar al proceso de fabricación y/o por razones estéticas, por ejemplo, color. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero no están limitados a, varios azúcares como maltosa o D-sorbitol; glicina; excipientes poliméricos, como PEG o proteínas séricas, como la albúmina.

40 La composición de inmunoglobulina puede comprender por lo menos el 95% de inmunoglobulina G humana normal como ingrediente activo, el 10% de maltosa y agua para inyección. El contenido de inmunoglobulina A (IgA) puede ser igual o menor a $\leq 0,15$ mg/ml.

45 Otro objeto más de la invención se logra proporcionando un método para tratar a un sujeto que padece una inmunodeficiencia, por ejemplo, inmunodeficiencia primaria y secundaria, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune o una infección aguda, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición de inmunoglobulina de acuerdo con la invención.

50 El término "sujeto" incluye animales de origen mamífero, incluyendo humanos. En una realización, el sujeto es un paciente.

55 El término "una cantidad eficaz" se refiere a la dosis requerida para prevenir o tratar (aliviar un síntoma o todos los síntomas) una enfermedad, trastorno o afección. La cantidad eficaz puede medirse en base a cualquier cambio en el curso de la enfermedad en respuesta a la administración de la composición. La dosis eficaz puede cambiarse dependiendo de la edad y el peso del sujeto, la enfermedad y su gravedad (por ejemplo, etapa temprana o avanzada) y otros factores que pueden ser reconocidos por los expertos en la técnica.

60 La composición de inmunoglobulina puede usarse para terapia de reemplazo como en inmunodeficiencia primaria (pacientes con síntesis de anticuerpos defectuosos primaria como agammaglobulinemia o hipogammaglobulinemia); leucemia linfocítica crónica (CLL) con hipogammaglobulinemia secundaria grave e infecciones recurrentes, en quienes los antibióticos profilácticos han fallado; mieloma en fase de meseta con hipogammaglobulinemia e infecciones bacterianas recurrentes que no han respondido a la inmunización neumocócica; pacientes con hipogammaglobulinemia I después de un trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) alogénico; niños con SIDA congénito e infecciones recurrentes; y trasplante de médula ósea alogénico; y en

65

inmunomodulación como en polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP); púrpura trombocitopénica idiopática (ITPI); síndrome de Guillain-Barré; y la enfermedad de Kawasaki.

5 La dosis y el régimen de dosificación dependen del uso previsto. En la terapia de reemplazo, la dosificación puede necesitar ser individualizada para cada paciente, dependiendo de la respuesta farmacocinética y clínica.

10 La composición de inmunoglobulina preparada de acuerdo con la invención que tiene bajos niveles de agentes trombogénicos puede administrarse por vías que llevan a la absorción sistémica. Ejemplos no limitativos de vías de administración incluyen, pero no se limitan a, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal e intramuscular. Ventajosamente, los pacientes pueden recibir una dosis alta de la solución de inmunoglobulina preparada de acuerdo con la invención que tiene bajos niveles de agentes trombogénicos. La administración puede llevarse a cabo en una dosis inicialmente más alta, por ejemplo, 0,4-0,8 g/kg seguido de la misma dosis o dosis más bajas a intervalos. Puede pretenderse que las dosis más altas aumenten rápidamente la concentración de inmunoglobulina del paciente a una concentración objetivo eficaz.

15 El término "intravenoso" se refiere a la administración de la composición en la vena de un sujeto. La administración puede ser intermitente o por goteo continuo. El término "intermitente" es sinónimo del término "bolo intravenoso" o "pulso intravenoso".

20 El término "subcutáneo" se refiere a la introducción de la composición por inyección debajo de la piel de un sujeto. La inyección puede llevarse a cabo creando un bolsillo como pellizcando o estirando la piel hacia arriba y lejos del tejido subyacente. Opcionalmente, la infusión puede llevarse a cabo mediante implantación subcutánea de una bomba de administración de fármacos implantada debajo de la piel del sujeto. La bomba puede suministrar una cantidad predeterminada de inmunoglobulina a una tasa predeterminada durante un período de tiempo predeterminado.

25 Por "intramuscular" se entiende una introducción de la composición de inmunoglobulina directamente en un músculo. Las inyecciones pueden administrarse en cualquier músculo incluyendo, pero no limitado a, los músculos deltoides, vasto lateral, ventrogluteal y dorsogluteal. La administración puede llevarse a cabo en múltiples localizaciones. La "inyección intraperitoneal" se refiere a la inyección de la inmunoglobulina en el peritoneo.

30 La composición de inmunoglobulina de la invención puede prepararse a partir de sangre o fracciones de sangre donadas por donantes sanos. La inmunoglobulina puede prepararse a partir de sangre o fracciones de sangre agrupadas obtenidas de 1000 donantes y más. La inmunoglobulina puede prepararse a partir de donantes seleccionados con altos títulos de anticuerpos. Un ejemplo de tal técnica se divulga en la WO-2007/017859 cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia. El término "fracción de sangre" se refiere a una fracción de sangre completa que comprende inmunoglobulinas como plasma o suero. La composición de inmunoglobulina puede obtenerse volviendo a suspender Pasta II, a partir del fraccionamiento en plasma, por ejemplo, de acuerdo con el fraccionamiento de Cohn y/o el método de fraccionamiento de Kistler-Nitschmann (KN).

35 Las composiciones de inmunoglobulina derivadas de componentes sanguíneos se purifican típicamente a partir de partículas infecciosas. La inactivación viral puede llevarse a cabo por filtración, nanofiltración, tratamiento con solvente/detergente, tratamiento térmico como, pero no limitado a, pasteurización, irradiación gamma o UVC (<280 nm), o por cualquier otro método conocido en la técnica.

40 En una realización de la invención, la composición de inmunoglobulina se purifica por el método de solvente-detergente usando TnBP/Triton-X-100, y por nanofiltración a pH-4.

45 El término "partícula infecciosa" se refiere a una partícula microscópica como, pero no limitado a, un microorganismo o un prión, que puede infectar o propagarse en las células de un organismo biológico. Las partículas infecciosas pueden ser partículas virales.

50 El procedimiento de inactivación de partículas infecciosas puede llevarse a cabo mediante la adición de una molécula inactivadora a la composición antes y/o durante el procedimiento de purificación. Las moléculas añadidas y sus productos pueden eliminarse por gravitación, cromatografía en columna o por cualquier otro método conocido en la técnica. La eliminación de partículas infecciosas puede llevarse a cabo mediante nanofiltración o mediante métodos de absorción selectiva, como la afinidad, el intercambio iónico o la cromatografía hidrófoba. Puede llevarse a cabo un procedimiento de inactivación viral de múltiples pasos. Por ejemplo, la solución que contiene inmunoglobulina puede someterse a tratamiento con solvente/detergente, tratamiento térmico, cromatografía selectiva y nanofiltración.

55 El término "inactivación viral" se refiere tanto a la situación en la que los virus se mantienen en la solución pero se vuelven inviábiles (por ejemplo, disolviendo su capa lipídica), y/o como a la situación en la que los virus se eliminan físicamente de la solución (por ejemplo, por técnicas de exclusión por tamaño).

65

El "tratamiento con solvente/detergente (S/D)" se refiere típicamente a un proceso que inactiva los virus recubiertos con envoltura al destruir su envoltura lipídica. El tratamiento puede llevarse a cabo mediante la adición de detergentes (como Triton X-45, Triton X-100 o Tween 80) y solventes [como tri(n-butil) fosfato (TnBP), di- o trialquilfosfatos]. La combinación de solvente-detergente usada para desactivar virus recubiertos de lípidos puede ser cualquier combinación de solvente-detergente conocida en la técnica como TnBP y Triton X-100; Tween 80 y colato de sodio y otros. La concentración de los solventes detergentes puede ser la usada comúnmente en la técnica, por ejemplo, >0,1% de TnBP y >0,1% de Triton X-100. Típicamente, las condiciones bajo las cuales el solvente-detergente inactiva los virus consisten de 10-100 mg/ml de solvente-detergente a un nivel de pH que varía entre 5-8, y una temperatura que varía entre 2-37° C durante 30 min. a 24 horas. Sin embargo, otras combinaciones de solvente detergente y condiciones adecuadas serán evidentes para cualquier persona con experiencia en la técnica. La mayor parte del solvente-detergente usado en el tratamiento S/D se puede eliminar, por ejemplo, usando columnas de cromatografía, como la columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), por ejemplo, material de compactación de sílice C-18 y SDR (eliminación de solvente-detergente) HyperD; matrices de adsorción de proteínas como matrices de intercambio iónico; matrices de afinidad; y/o matrices de exclusión por tamaño. La eliminación de S/D puede comprender además un paso de extracción de aceite.

La "nanofiltración" se refiere típicamente a un proceso mediante el cual los virus con y sin envoltura de lípidos se excluyen de la solución, por ejemplo, usando filtros especiales a escala nanométrica como Planova™ 20N, 35N y 75N; Viresolve/70™, Viresolve/180™. Los filtros pueden tener un tamaño de poro de menos de 70 nm, preferiblemente entre 15 y 50 nm. Sin embargo, en nanofiltración puede emplearse cualquier membrana que tenga un tamaño de poro suficiente para reducir o eliminar virus de la solución. Los virus eliminados por nanofiltración pueden tener envoltura [por ejemplo, VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del Nilo Occidental, citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus del herpes simple] y no tener envoltura (por ejemplo, virus de la hepatitis A, paravirus B19, virus de la polio). Ejemplos de técnicas de purificación de inmunoglobulina se divulgan en la Patente de Estados Unidos N° 6.468.733, Patente EP N° 1.161.958 y Publicación Internacional de PCT WO 99/18130 cuyos contenidos se incorporan por referencia. Por ejemplo, un método para la purificación de inmunoglobulinas a partir de una solución fuente como la Fracción II Cohn puede comprender: (a) pretratar una resina de intercambio catiónico con una solución ácida que tiene un pH de 4,0-4,5; (b) poner en contacto la solución fuente con la resina de intercambio catiónico; y (c) eluir las inmunoglobulinas unidas a la resina de intercambio catiónico. Antes del contacto con la resina de intercambio catiónico, la solución fuente puede tratarse con un solvente orgánico y detergente.

Otro método para la purificación de inmunoglobulinas puede comprender: (a) tratar la solución con una combinación de solvente-detergente, a concentraciones y bajo condiciones que sean suficientes para inactivar los virus recubiertos de lípidos; (b) eliminar la combinación de solvente-detergente de la solución pasando la solución obtenida en (a) sobre un relleno cromatográfico compuesto de perlas de sílice cuyo volumen de poro se llena con polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional; y (c) pasando la solución del paso (b) a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 70 nm como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.468.733.

La composición de inmunoglobulina puede concentrarse mediante un proceso de ultrafiltración. La ultrafiltración puede ser seguida por diafiltración para intercambiar el tampón. La concentración y la diálisis por ultrafiltración y diafiltración, respectivamente, pueden realizarse en un paso o como dos pasos separados. La diafiltración puede llevarse a cabo contra cualquier solución que sea adecuada para la administración humana. Los ejemplos no limitativos de tales soluciones incluyen, pero no se limitan a, 0,3% de NaCl y de aproximadamente 1,6 a aproximadamente 2,6% de glicina, como aproximadamente 2,25%.

Ejemplos

50 Materiales y Métodos.

Solución de inmunoglobulina.

55 a) Resuspensión de Pasta II.

Se transfirió pasta II (45 Kg), preparada a partir de plasma por el método de fraccionamiento de Cohn (Cohn, E.J. The history of plasma fractionation. In Advances in Military Medicine, Andrus et al. Eds. Little, Brown & Co, 1948), a un tanque triturador al que se le añadió agua para inyección (WFI) fría (4° C) (3 veces el peso de la pasta II) para lograr un peso final de 180 kg. La pasta resuspendida se agitó primero durante un período de aproximadamente 5 horas a 4-6° C, y luego se decantó a 4-6° C sin agitación durante aproximadamente 37 horas, para permitir la precipitación de los principales agregados de proteínas. Después de la precipitación, el sobrenadante se separó del precipitado y se usó para el paso siguiente.

65 b) Filtración CUNO

El sobrenadante obtenido en el paso anterior se filtró a través de un par paralelo de filtros de profundidad cargados positivamente CUNO de 0,2 μm (Cuno Zeta Plus, Cuno incorporation Inc. CT USA), para eliminar los agregados. La presión del filtro no excedió 1,0 Bar durante el paso de filtración. El caudal de fluido durante la filtración fue de 60 l/h y la temperatura fue de 7,2° C.

5

c) Cromatografía de intercambio aniónico: columna de dietilaminoetilcelulosa (DEAE).

En el siguiente paso, la solución resultante del paso b) se sometió a un intercambiador aniónico (ver los Ejemplos 7-11).

10

A menos que se indique lo contrario, la columna de DEAE se equilibró con un valor de 7 columnas (CV; es decir, 77 ml) de agua pura (o WFI) a un caudal de fluido de 2,8 ml/min. Después del equilibrio, se cargó en la columna la solución de inmunoglobulina resultante del paso b). La presión de la columna no excedió de 1,0 Bar.

15

En el caso de procesamiento adicional, el paso c), a menos que se indique lo contrario, se llevó a cabo usando las siguientes condiciones (condiciones de aumento progresivo): se usó la columna de DEAE (Toyopearl DEAE-650M; TOSOHAAS) como intercambiador aniónico [7,5 l de resina. El diámetro de la columna era de 35 cm; y una altura de lecho de 15 cm]. La columna se lavó con 360 l de WFI a un caudal de fluido de 110 l/hora. La carga se realizó como después de la filtración CUNO a un caudal de fluido de 60 l/hora a 8-10° C (temperatura del material). El volumen de carga de la solución de inmunoglobulina fue de 18 volúmenes de columna, el pH de la solución sometida fue de 7-7,6. La cromatografía se realizó a temperatura ambiente (22 \pm 2° C).

20

d) Ajuste de pH

25

El pH de la solución se ajustó a 4,59 añadiendo HCl 0,5 M bajo agitación continua.

La temperatura se mantuvo a 8 \pm 2° C. Para eliminar los agregados, la solución se filtró a través de un filtro de 0,45 μm -0,65 μm (Sartobran) en un recipiente limpio.

30

e) Concentración a 90 g/l y diafiltración

La solución resultante de d) se ultrafiltró usando un casete de ultrafiltración que contenía una membrana con un límite de exclusión de 30.000 D (Filtron Maxisette; 30 KD). El casete se preparó lavando con 500 kg de WFI. Durante la ultrafiltración, la solución de proteína (200 Kg) se concentró a 90 g/l (un peso final de 141 Kg). Este paso fue seguido por diafiltración contra 705 Kg de WFI a volumen constante para eliminar el etanol residual y disminuir la osmolalidad a <30 mOsm/Kg. La concentración de proteína se ajustó luego a 73 g/l con WFI para alcanzar un volumen final de 173 kg. La temperatura se mantuvo a 8 \pm 2° C durante todo este paso.

35

Se llevó a cabo una cromatografía de intercambio catiónico [usando la membrana Mustang® S, cápsula Mustang® S, columna SP o columna CM (para las condiciones específicas, ver los Ejemplos 2-4, Ejemplo 5, Ejemplo 1 y Ejemplo 1, respectivamente)] siguiendo el paso c)- usando la columna SP o siguiendo el paso e)- usando la membrana Mustang® S o la cápsula Mustang® S.

40

Cuando se llevó a cabo la cromatografía de intercambio catiónico siguiendo el paso c)- se sometieron a cromatografía aproximadamente 50-60 mg/ml de proteína. Cuando se llevó a cabo la cromatografía de intercambio catiónico siguiendo el paso e), se sometieron a cromatografía aproximadamente 70 mg/ml de proteína.

45

Para reducir los agregados, antes de someter la solución de inmunoglobulina al intercambiador catiónico, la solución se filtró a través de un filtro [filtro de profundidad de 1,2 μm obtenido de Sartorius sartopure (antes de la columna SP) o un filtro CA de 0,2 μm obtenido de Corning (antes de la membrana Mustang® S o la cápsula Mustang®)].

50

Para la columna SP, la columna se equilibró antes de cargar la solución de inmunoglobulina con 20 ml de tampón de acetato 20 mM que tenía un nivel de pH compatible como la solución de inmunoglobulina a cargar.

55

Para la membrana Mustang® S, la membrana del filtro se equilibró antes de cargar la solución de inmunoglobulina con 20 ml de tampón de acetato 20 mM que tenía un nivel de pH compatible como la solución de inmunoglobulina a cargar.

60

Para la cápsula Mustang® S, la cápsula se preconditionó antes del equilibrio de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A menos que se indique lo contrario, en el paso siguiente, la cápsula se equilibró con 600 ml de tampón de acetato 20 mM con un nivel de pH de 4,2. Tratamiento solvente/detergente (S/D).

65

La solución de inmunoglobulina se equilibró a un pH de 5,3 y se sometió a tratamiento S/D (para inactivar los virus con envoltura lipídica) de la siguiente manera: Se mezclaron 1% de Triton X-100 y 0,3% de tri(n-butil)

fosfato (TnBP) (v/v) y luego se añadieron lentamente a la solución mientras se agitaba rápidamente (20 Hz) la solución. La solución se incubó luego durante aproximadamente 4,5 horas a 6,9° C, bajo agitación constante suave. Al final del período de incubación, la temperatura se elevó a 23° C durante un período de 1-1,5 horas y bajo agitación (a una velocidad de 20 Hz). En el paso siguiente, la solución tratada con SD se filtró secuencialmente a través de un filtro de 3 µ de profundidad (Sartorius) seguido de un filtro de membrana de 0,45-0,65 µm (Sartorius) (para eliminar los restos de particulado grueso antes de un paso posterior de eliminación de S/D).

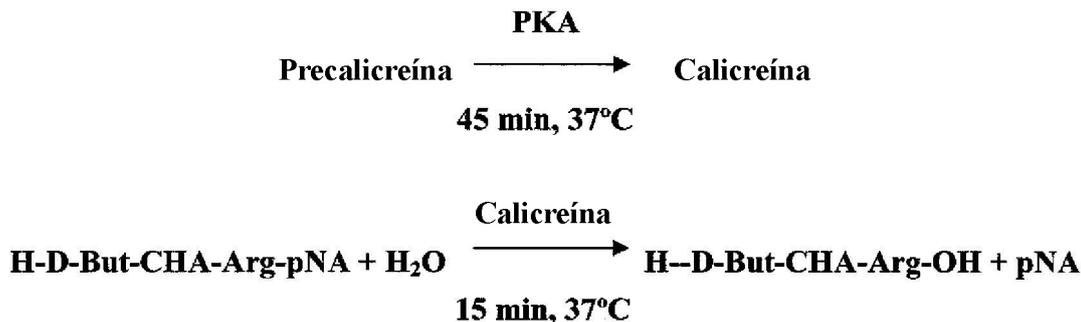
Eliminación de S/D por columna SDR.

La eliminación del S/D se llevó a cabo mediante una columna dedicada de resina de cromatografía de eliminación de solvente-detergente HyperD (SDR-HyperD de Biosepra). Antes de cargar la solución de inmunoglobulina tratada con SD, la columna se preparó con 450 Kg de WFI (a una presión máxima de 0,8 bar) y a un caudal de 80 l/h. La longitud de la columna fue de 54 cm, con un diámetro de 28 cm y el volumen de la resina fue de 30-32 l. El caudal fue de 78 L/h, y se usaron 37 Kg de WFI para lavar la columna después de cargar la muestra para lograr el valor de referencia. El flujo total a través del volumen recogido fue de 176,7 kg.

Mediciones de los niveles de activador de precalicreína.

El activador de precalicreína (PKA), el primer zimógeno en la cascada de coagulación intrínseca, activa la precalicreína a calicreína. En este ensayo, la precalicreína (que se añade a la muestra analizada) se activa a calicreína por el PKA que se encuentra en la muestra analizada. La calicreína formada luego escinde un sustrato cromogénico (H-D-But-CHA-Arg-pNA) a p-nitroanilina (pNA) coloreada a una velocidad constante (ver la reacción a continuación). La reacción puede medirse espectrofotométricamente a 405 nm.

El color obtenido es proporcional a la cantidad de PKA presente en la muestra analizada.



Todos los reactivos requeridos provienen del kit de ensayo del activador de precalicreína (Diagnóstico de ruta; Código de producto: PW30100). El ensayo se realizó a 37° C.

Más específicamente, el ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera:

i) Paso A para preparaciones en blanco: 25 µl de cada dilución estándar de PKA (0, 3,125, 6,25, 12,5 y 18,75 UI/ml. Las varias concentraciones de PKA se prepararon a partir de una solución de PKA diluida con el kit del tampón); se pipetaron el control positivo [un estándar internacional de la FDA para PKA que contenía 10 UI/ml de PKA]; o las muestras de prueba diluidas (dilución 1:2 con el kit del tampón) en una microplaca de 96 pocillos.

ii) Pasos para los estándares de PKA, control positivo y muestras de prueba: se pipetaron 25 µl de cada dilución estándar de PKA o muestras de prueba diluidas (las mismas diluciones que se prepararon anteriormente) en un tubo eppendorf. Luego, se añadieron 50 µl de solución de precalicreína humana en cada tubo eppendorf. El tubo se tapó y se mezcló y se transfirieron 25 µl de cada tubo eppendorf (por duplicado) a pocillos de microplacas.

iii) En el siguiente paso, la placa se incubó durante 30 minutos a 37° C.

iv) Paso B para preparaciones en blanco: después de 30 minutos de incubación, se añadieron 50 µl de una solución de precalicreína humana precalentada (37° C) en todos los espacios en blanco (ver preparaciones del paso i), y el contenido del pocillo se mezcló usando un pipeta. Luego, se transfirieron 25 µl del contenido de cada uno de estos pocillos inmediatamente (por duplicado) a los pocillos de microplacas correspondientes. La microplaca se incubó a 37° C durante aproximadamente 15 minutos adicionales (un total de 45 minutos de período de incubación).

v) Pasos para todas las preparaciones: se añadieron a todos los pocillos (pocillos de los pasos ii y iv) 100 μ l de solución de trabajo de sustrato de calicreína precalentada (a 37° C) (una solución que comprende el sustrato cromogénico).

5 vi) La microplaca se colocó en un lector ELISA (a 37° C) y se midió la densidad óptica (OD) a 405 nm después de 2 min ($OD_{2\text{ min}}$) y una vez más después de 12-17 minutos de incubación ($OD_{x\text{ min}}$.)

La OD obtenida para los espacios en blanco se sustrajo de la OD obtenida para las muestras de prueba correspondientes.

10 El contenido de PKA se calculó usando $\Delta OD_{(x-2)}$ (después de restar el espacio en blanco de cada lectura) como se interpola a partir de una curva de calibración estándar teniendo en cuenta el factor de dilución relevante. Los resultados se presentan en unidades internacionales/ml.

15 Ensayo de generación de trombina - para la estimación de eliminación de FXI/FXIIa.

El ensayo de generación de trombina (TGA) es un método hemostático global que mide la cantidad de trombina generada y degradada a lo largo del tiempo. Este ensayo estima la capacidad (o potencial) de cualquier muestra dada para generar trombina cuando se desencadena la cascada de coagulación (ya sea por un desencadenante intrínseco o extrínseco). La TG se monitoriza mediante la conversión de un sustrato de trombina fluorogénica y la calibración de la generación de trombina de la muestra frente a un estándar de actividad de trombina definido.

20 El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de fondo redondo (fondo U) transparentes y fluorómetro termoelectrónico ("Fluoroskan FL") equipado con un conjunto de filtros de 390/460 nanómetros y un dispensador.

Para medir los niveles de FXI/FXIIa, se usó plasma deficiente en FXI (obtenido de Stago; número de catálogo 00723) y la cascada de coagulación se desencadenó por factor tisular 1 pM (lleva a la activación de la vía de coagulación extrínseca) y fosfolípidos 4 μ M (lleva a la activación de la vía de coagulación intrínseca) (el factor tisular y los fosfolípidos se mezclan entre sí y se proporcionan en un reactivo-PPP-reactivo bajo; Stago; número de catálogo TS 31.00). La medición se realizó de acuerdo con: "The Thrombogram Guide" (Thrombinoscope BV): resumen del método para medir la generación de trombina usando el trombograma automatizado calibrado" con las siguientes modificaciones:

30 Para la medición, se mezclaron 20 μ l de la muestra analizada (que sirve como fuente potencial de FXIIa) con 60 μ l de plasma deficiente en FXI y 20 μ l de reactivo PPP bajo en el pocillo.

Cada muestra individual probada requiere una muestra de calibrador correspondiente (que comprende una cantidad conocida de trombina) y la muestra analizada. Para la medición de la muestra del calibrador de trombina, se mezclaron 20 μ l de la muestra analizada, 60 μ l de plasma deficiente en FXI, y 20 μ l de calibrador de trombina (Stago; número de catálogo TS 20.00).

40 La reacción de generación de trombina (a 37° C) se inició tras la adición de 20 μ l que contienen el sustrato fluorescente y Ca^{2+} [el sustrato fluorescente y Ca^{2+} se proporcionan en Flucakit (Stago; número de catálogo TS 50.00) y se mezclan entre sí de acuerdo con las instrucciones del fabricante]. La adición del sustrato fluorescente y el Ca^{2+} se realiza automáticamente mediante el "Fluoroskan FL".

45 La cantidad de trombina generada (en nM) se calculó luego usando el software del instrumento Thrombinoscope BV (provisto con el "Fluoroskan FL"). La cantidad final de trombina en la muestra analizada se calculó reduciendo el valor de fondo de tanto el valor de la muestra analizada como del valor del calibrador de trombina y extrapolando la cantidad de trombina en la muestra del valor del calibrador de trombina. El valor de fondo se obtiene con 60 μ l de plasma deficiente en FXI suplementado con 20 μ l de tampón que contiene 20 mM de tampón de acetato.

50 Mediciones de los niveles de Factor XIIa (FXIIa) (método fluorogénico).

55 Los niveles de Factor XIIa se midieron por un método fluorogénico. En el método, FXIIa escinde un sustrato fluorogénico específico en presencia de calcio. En la reacción de escisión, el sustrato (que está compuesto de un grupo informador fluorescente 6-amino-1-naftalenosulfonamida (ANSN) unido a una secuencia de tri-péptido) se hidroliza entre la secuencia de tri-péptido y el grupo ANSN. Una vez escindido de la fracción peptídica, el grupo ANSN muestra un aumento de aproximadamente 1000 veces en la fluorescencia relativa. Esta actividad está directamente relacionada con la cantidad de Factor XIIa en la muestra. La fluorescencia desarrollada se mide usando un lector ELISA con las siguientes longitudes de onda: excitación a 350 nm y emisión a 470 nm. Más específicamente, la medición se llevó a cabo de la siguiente manera:

60 Primera etapa (Preparación de la 1ª placa de 96 pocillos) - Las muestras analizadas se analizaron o sin diluir (en el caso de que la muestra se pruebe después de someter la solución de inmunoglobulina al intercambiador catiónico o

diluida (1:10 en el caso de que la muestra se pruebe antes de someter la solución de inmunoglobulina al intercambiador catiónico). La dilución se llevó a cabo en tampón B [Hepes 40 mM, NaCl 300 mM, CaCl₂ 4 mM, solución 20 K de polietilenglicol (PEG) al 0,2%]. Se añadieron 50 µl de las muestras mencionadas anteriormente a un pocillo de una placa de 96 pocillos (Costar; número de catálogo 3797) por cuadruplicado.

5 Se preparó una curva estándar usando FXIa (Hematological Technologies Inc.; número de catálogo HCXIA-0160) diluido en el tampón A [Hepes 20 mM; Solución de NaCl 150 mM; BSA al 0,1% (p/v)] a las siguientes concentraciones: 140, 100, 70, 50 y 25 ng/ml. Se añadieron 50 µl de cada concentración a los pocillos por cuadruplicado. Se añadieron el control positivo (una preparación de inmunoglobulina que contenía aproximadamente 120 ng/ml de FXIa) y muestras en blanco (Tampón A) a cada placa por cuadruplicado (50 µl de cada muestra positiva y en blanco).

15 Segunda etapa (Preparación de la 2ª placa de 96 pocillos): para la reacción cinética se preparó una segunda placa de 96 pocillos (Costar; número de catálogo 3695) mediante la adición de 25 µl de solución de sustrato FXIa (Hematological Technologies Inc., número de catálogo SN-13a) diluido 1:100 en tampón B) en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Luego se transfirieron 25 µl de todas las muestras preparadas en la 1ª placa de 96 pocillos (muestras analizadas, muestras para la preparación de la curva estándar, muestras de control positivo y en blanco) a los pocillos paralelos en la segunda placa y la segunda placa se transfirió inmediatamente a un lector de ELISA (SpectraMax). Se usaron los siguientes parámetros para la lectura: Registro durante 15 minutos cada 30 segundos; Excitación: 350 nm; Emisión: 470 nm; Corte: 455 nm; Temperatura: 37° C; El agitador se activó 15 segundos antes de la primera lectura; y la tasa V_{max} [Unidad de fluorescencia relativa (FRU)/min] se midió de 0-900 segundos.

25 La V_{max} de la reacción cinética es un cálculo de la reacción, usando un ajuste de curva lineal. Se realiza una iteración progresiva usando los puntos de V_{max} y la pendiente del segmento de línea más empinada se informa como la tasa V_{max} como la RFU (Unidad de fluorescencia relativa).

30 La concentración de FXIa (ng/ml) en la muestra analizada fue extrapolada por el software a partir de una curva estándar generada usando FXIa (descrito anteriormente) teniendo en cuenta la dilución de la muestra (la muestra en blanco se sustrajo automáticamente).

El contenido de proteína se midió por el método de Biuret usando el reactivo de proteína total (Sigma Diagnostic INC., número de catálogo 541-2) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

35 La distribución de las subclases de IgG se midió usando el kit BIND A RID para el kit combinado de subclases de IgG humana (The Binding Site Ltd.; número de catálogo RK021) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 El título de anticuerpos anti-difteria se midió mediante el kit de difteria (VITROTECH) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El anticuerpo del antígeno de superficie de la hepatitis B (anti-HBsAg) se midió mediante un kit obtenido de Abbott Laboratories; número de catálogo: LBXHBS.

45 Mediciones de los niveles de calicreína (método cromogénico).

50 Los niveles de calicreína se midieron por un método cromogénico. En el método, la calicreína escinde un sustrato cromogénico específico. En la reacción de escisión, el sustrato de calicreína (que está compuesto de un grupo informador cromogénico para-nitroanilina (pNa) unido a una secuencia de oligopéptido del sustrato de calicreína) se hidroliza entre la secuencia de oligopéptido y el grupo pNa. Una vez escindido de la fracción peptídica, p-Na muestra una alta absorbancia a 405 nm. Esta actividad está directamente relacionada con la cantidad de calicreína en la muestra. La absorbancia observada se mide usando un lector ELISA a 405 nm. Más específicamente, la medición se lleva a cabo de la siguiente manera:

55 Primera etapa (Preparación de la 1ª placa de 96 pocillos): las muestras analizadas se analizaron o diluidas 1:5 (en el caso de que la muestra se analice después de someter la solución de inmunoglobulina al intercambiador catiónico o diluida 1:30 (en el caso de que la muestra se analice antes de someter la solución de inmunoglobulina al intercambiador catiónico). La dilución se llevó a cabo en tampón A [Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, BSA al 0,1% p/v]. Se añadieron 50 µl de las muestras mencionadas anteriormente a un pocillo de una placa de 96 pocillos (Costar; número de catálogo 3797) por cuadruplicado. Se preparó una curva estándar usando calicreína (Enzyme Research Laboratories; número de catálogo HPKa-1303) diluido en el tampón A a las siguientes concentraciones: 400, 200, 100, 50, 25 y 12,5 ng/ml. Se añadieron 50 µl de cada concentración a los pocillos por cuadruplicado. Se añadieron dos controles positivos (preparaciones de inmunoglobulina que contenían aproximadamente 70 y 15 ng/ml de calicreína) y muestras en blanco (tampón A) a cada placa por cuadruplicado (50 µl de cada muestra positiva y en blanco).

Segunda etapa (Preparación de la 2ª placa de 96 pocillos): para la reacción cinética se preparó una segunda placa de 96 pocillos (Costar; número de catálogo 3695) mediante la adición de 25 µl de solución de sustrato de caliceína {Biophen SC31 (02) (HYPHEN BioMed, número de catálogo 229031: reconstituida en 5 ml de agua purificada y luego diluida 1:7 en el tampón A} en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Luego, se transfirieron 25 µl de todas las muestras preparadas en la 1ª placa de 96 pocillos (muestras analizadas, muestras para la preparación de la curva estándar, control positivo y muestras en blanco) a los pocillos paralelos en la segunda placa y la segunda placa se transfirió inmediatamente a un lector de ELISA (SpectraMax). Se utilizaron los siguientes parámetros para la lectura: Registro durante 15 minutos cada 34 segundos; Absorbancia: 405 nm; Temperatura: 37° C; El agitador se activó 15 segundos antes de la primera lectura; y la tasa V_{max} [OD/min] se midió de 0- 900 segundos.

La V_{max} de la reacción cinética es un cálculo de la reacción, usando un ajuste de curva lineal. Se realiza una iteración progresiva usando los puntos de V_{max} y la pendiente del segmento de línea más empinado se informa como la tasa V_{max} como las unidades de absorbancia/min.

El software extrapoló la concentración de caliceína (ng/ml) en la muestra analizada a partir de una curva estándar generada usando caliceína (descrita anteriormente) teniendo en consideración la dilución de la muestra (la muestra en blanco se sustrajo automáticamente).

Ejemplo 1: El efecto del nivel de pH de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de la cromatografía de intercambio catiónico para eliminar FXIa de la solución.

El siguiente experimento estaba dirigido a determinar el efecto del nivel de pH de la solución de inmunoglobulina sobre la eliminación de FXIa de la solución por un intercambiador catiónico.

El punto isoeléctrico de FXIa es aproximadamente 9 (Bonno BN, Griffin JH. Human blood coagulation factor XI: purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XII. J Biol Chem 1977;252:6432-6437). Como se usa un intercambiador catiónico, puede usarse un nivel de pH inferior al punto isoeléctrico (en el que FXIa tiene una carga positiva neta). En este experimento, se evaluó el efecto de un intervalo de nivel de pH de 4-7.

Con este propósito, se preparó una solución de inmunoglobulina de acuerdo con los pasos a-c descritos en la sección de Materiales y Métodos. En el siguiente paso, se ajustó el pH de la solución o con NaCl 0,5 N o con NaOH 0,1 N al pH probado deseado (un intervalo de pH de 4-7; el nivel de pH de la solución se midió usando un dispositivo de monitorización de pH electrónico) y 100 ml de cada una de las soluciones de inmunoglobulina resultantes se sometieron a la columna de intercambio catiónico.

Se usó una columna de sulfopropilo (columna SP) como intercambiador catiónico. Preparación de la columna: se montaron 4 ml de resina SP (TOSOHAAS; número de catálogo Toyopearl, SP-650M) dentro de una columna de 1 cm de diámetro (Bio-Rad) logrando una altura de lecho de 6 cm. La cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) a un caudal de 2 ml/min. La temperatura de la solución cargada fue de $22 \pm 2^\circ \text{C}$.

Para evaluar la eliminación de FXIa, se midió el nivel de FXIa en el material de carga ("Carga") y después de recoger la solución de la columna ("No unida"). La medición se llevó a cabo mediante el ensayo TG como se describe en la sección Materiales y Métodos. En este experimento, los valores de generación de trombina en el material de carga estuvieron en el intervalo de 246-271 nM.

Para estimar la recuperación de IgG en la fracción no unida, se midió la recuperación total de proteínas (%) (la IgG consiste de aproximadamente el 95% de la proteína total). Los resultados se presentan en la Tabla 1 siguiente.

El punto isoeléctrico de IgG es 6-8. Por tanto, a un nivel de pH inferior a 6, la IgG (que tiene una carga neta positiva) también puede unirse al intercambiador catiónico (además de a FXIa), lo que da como resultado recuperaciones bajas de IgG.

Tabla 1- El efecto del nivel de pH de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de un intercambiador catiónico para eliminar FXIa de la solución y sobre la recuperación de proteínas total.

Nivel de pH del material de carga	Muestra	Trombina (nM)	Recuperación de proteínas total (%)*
4	No unida	40.5	97.2
4.6	No unida	42	92.6
5.3	No unida	48.7	91.1
5.7	No unida	68.9	92.1
6.1	No unida	71	92.8
6.5	No unida	102.6	98.1
7	No unida	110.8	94

* La evaluación se realizó comparando el contenido de proteína (usando el método de Biuret) antes ("carga") y después ("no unida") sometiendo la solución a la columna

Los resultados muestran que niveles de pH superiores a 6 dieron como resultado una eliminación pobre de FXIa (valores de TG altos) y niveles de pH inferiores a aproximadamente 6 dieron como resultado una eliminación de FXIa alta (valores de TG bajos) de la solución de inmunoglobulina y al mismo tiempo con una alta recuperación de IgG (como se mide por la recuperación de proteínas total). Estos resultados son sorprendentes ya que a un nivel de pH inferior a 6, la IgG (que tiene un punto isoeléctrico de 6-8) tiene una carga eléctrica neta positiva y, como tal, se esperaba que se uniese a los grupos cargados negativamente de la columna de intercambio catiónico y, por tanto, se esperaba una recuperación de IgG baja.

Se llevó a cabo otro conjunto de experimentos usando una columna de carboximetilo (CM) (un intercambiador catiónico débil obtenido de TOSOHAAS; número de catálogo Toyopearl, CM-650M). El experimento se llevó a cabo en las mismas condiciones que la columna SP. Con la columna CM solo se examinó un intervalo de pH bajo de 4-5,5. Los resultados fueron comparables con los resultados obtenidos con la columna SP mostrando que al pH probado (4-5,5) se obtuvo una alta eliminación de FXIa y al mismo tiempo una alta recuperación de IgG. El volumen de resina fue de 8 ml; el diámetro de la columna era de 1 cm y la altura del lecho era de 10 cm.

Ejemplo 2: El efecto del nivel de pH de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de la membrana Mustang® S (un intercambiador catiónico) para eliminar FXIa de la solución.

El siguiente experimento estaba dirigido a examinar el efecto de los niveles de pH bajos de la solución de IVIG sobre la eliminación de FXIa de la solución usando un intercambiador catiónico de membrana Mustang® S [filtros circulares; Volumen del lecho de membrana (MV) = 0,35 ml; Pall; número de catálogo NP8MSTGSP1]. En este experimento se evaluó el efecto de un intervalo de nivel de pH de 3,8-5,3 de la solución de inmunoglobulina sobre la eliminación de FXIa.

Para este propósito, se preparó una solución de inmunoglobulina de acuerdo con los pasos (a) a (e) descritos anteriormente en la sección Materiales y Métodos. En el siguiente paso, se ajustó el pH de la solución diafiltrada con NaCl 0,5 N o NaOH 0,1 N al pH probado deseado (un intervalo de pH de 3,8-5,3) y se sometieron 30 ml de cada una de las soluciones de inmunoglobulina resultantes a la membrana Mustang® S. La cromatografía se llevó cabo a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) a un caudal de 1,5 ml/min. La temperatura de la solución cargada fue de $22 \pm 2^\circ \text{C}$.

El nivel de FXIa se midió en la solución de inmunoglobulina antes ("Carga") y después ("No unida") sometiendo las soluciones al intercambiador catiónico. La evaluación se llevó a cabo mediante un método fluorogénico como se describe en la sección Materiales y Métodos en "Mediciones de los niveles de FXIa". Los resultados se presentan en la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2- El efecto del nivel de pH de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de un intercambiador catiónico para eliminar FXIa.

Nivel de pH del material de carga	FXIa (ng/ml) Usando un método fluorogénico		Eliminación de FXIa (%)*
	Carga	No unida	
3.8	270.5	129.2	52.24
4	302.2	34.5	88.58
4.3	422.4	50.1	88.09
4.5	360.2	67.8	81.18
4.7	312.7	53.9	82.76
5	367.8	76.6	79.17
5.3	340.9	81.4	76.12

* Calculado comparando los niveles de FXIa antes ("carga") y después ("no unida") sometiendo la solución a la columna.

Los resultados obtenidos muestran que los niveles de pH superiores a 3,8 dieron como resultado una eliminación eficiente de FXIa de la solución de inmunoglobulina con un nivel de pH óptimo estando en un intervalo de 4,0 a 5,0 (pH en el que se observó el porcentaje más alto de eliminación de FXIa).

En otro conjunto de experimentos se evaluó el efecto de un nivel de pH más alto (hasta 7,4). El experimento se llevó a cabo de la misma manera que el experimento anterior, excepto que se cargaron 20 ml de soluciones de inmunoglobulina en el intercambiador catiónico (membrana Mustang® S); y la filtración se llevó a cabo a un caudal mayor de 2,5 ml/min.

El nivel de FXIa se midió en el material de carga ("Carga") y en la fracción no unida 10 (se recogieron 10 fracciones de 2 ml y la medición se realizó en la fracción 10). La medición se llevó a cabo como anteriormente por el método fluorogénico. Los resultados se presentan en la Tabla 3 siguiente.

Tabla 3- El efecto del nivel de pH de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de la membrana Mustang® S para eliminar FXIa.

nivel de pH del material de carga	FXIa (ng/ml) Usando un método fluorogénico		Eliminación de FXIa (%)*
	Carga	Fracción 10 no unida	
5	116.7	28.3	75.75
6	115.6	68.5	40.74
7.4	112.1	144.5	-

* Calculado comparando los niveles de FXIa antes ("carga") y después ("no unida") sometiendo la solución a la columna.

Sorprendentemente, los resultados obtenidos muestran que aunque FXIa tiene una carga neta positiva en un nivel de pH inferior a aproximadamente 9 (su punto isoeléctrico es 8,9-9,1), la eliminación de FXIa ineficaz se obtuvo a un pH de 6 y superior.

Ejemplo 3: El efecto del caudal de fluido sobre la eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina por cromatografía de intercambio catiónico.

El siguiente experimento examina el efecto del caudal de fluido en la eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina mediante una cromatografía de intercambio catiónico. Se evaluaron los siguientes caudales: 0,7, 1, 1,5, 2,5 ml/min. La solución de inmunoglobulina de partida usada fue como en el Ejemplo 2 y se usó la misma membrana Mustang® S como intercambiador catiónico.

En vista de los ejemplos anteriores, el pH de la solución de inmunoglobulina se ajustó a 4,2 (para una

solución de inmunoglobulina cargada a un caudal de 0,7, 1 y 2,5 ml/min) o 4,3 (para una solución de inmunoglobulina cargada a un caudal de 1,5 ml/min) antes de cargar la solución de inmunoglobulina al intercambiador catiónico. La cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), la temperatura de la solución cargada en el intercambiador catiónico fue de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ y se aplicó un volumen de 30 ml de solución de inmunoglobulina al intercambiador catiónico.

El nivel de FXIa se midió en la solución de inmunoglobulina antes ("Carga") y después ("No unida") de cargar las soluciones al intercambiador catiónico. La medición se llevó a cabo directamente por el método fluorogénico e indirectamente por el ensayo TG como se describe anteriormente en la sección Material y Método. En este experimento, los valores de generación de trombina en el material de carga estuvieron en el intervalo de 179-290 nM.

Los resultados se presentan en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4- El efecto del caudal de fluido durante la cromatografía de intercambio catiónico sobre la eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina.

Caudal del material de carga (ml/min)	FXIa (ng/ml)		Eliminación de FXIa (%)***	Trombina (nM) Usando el ensayo TG
	Usando un método fluorogénico			No unida
	Carga	No unida*		
0.7	342.6	40.8	88.09	43.0
1.0	283.5	45.1	84.09	25.2
1.5	422.4	50.1	88.14	0.0
2.5	304.0	80.7	73.45	63.3

* Para un caudal de 0,7, 1 y 2,5 ml/min, se recogieron 15 fracciones (cada una contenía 2 ml) y para la evaluación de los niveles de FXIa se usó una mezcla de fracciones no unidas: 2, 5,7,10 y 13.
 Para un caudal de 1,5 ml/min, se usó la fracción no unida completa para la evaluación.
 ** Como el volumen del lecho de membrana del Mustang (MV) es de 0,35 ml a 0,7 ml/min = 2 MV/min; 1 ml/min = 2,9 MV/min; 1,5 ml/min = 4,3 MV/min; y 2.5 ml/min = 7,1 MV/min.
 *** Calculado comparando los niveles de FXIa antes ("carga") y después ("no unida") sometiendo la solución a la columna.

Se observó, de acuerdo con el método fluorogénico, que el caudal óptimo para la eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina estaba en el intervalo de 0,7-1,5 ml/min (el porcentaje de eliminación de FXIa más alto se observó en este intervalo de caudal). También se observa que de acuerdo con el ensayo TG, el caudal óptimo para la eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina (el nivel de trombina más bajo obtenido en la fracción no unida en comparación con los otros caudales probados) fue de 1,5 ml/min.

Estos resultados indican que para mejorar adicionalmente la eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina, puede usarse un caudal inferior a 2,5 ml/min, como un caudal en el intervalo de 0,7 a 1,5 ml/min (2-4,3 MV/min) cuando se somete la solución a la membrana del intercambiador catiónico.

Ejemplo 4: El efecto del nivel de temperatura de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de la eliminación de FXIa por cromatografía de intercambio catiónico.

El siguiente experimento examina el efecto del nivel de temperatura de una solución de inmunoglobulina sobre la eliminación de FXIa por cromatografía de intercambio catiónico. Para este propósito, la solución de inmunoglobulina se equilibró a las siguientes temperaturas: 7°C , temperatura ambiente (22 ± 2) y 37°C . La solución de inmunoglobulina de partida usada fue como en el Ejemplo 2 y se usó la misma membrana Mustang® S como intercambiador catiónico.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los Ejemplos 2 y 3, el pH de la solución de inmunoglobulina se ajustó a 4,2 antes de someter la solución al intercambiador catiónico, y la solución de inmunoglobulina se cargó al intercambiador catiónico a un caudal de 1-1,5 ml/min. La cromatografía en sí se llevó a cabo a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), y se aplicó un volumen de 30 ml de solución de inmunoglobulina equilibrada a las diferentes temperaturas al intercambiador catiónico.

El nivel de FXIa se midió en la solución de inmunoglobulina antes ("Carga") y después ("No unida") sometiendo las soluciones al intercambiador catiónico. Como en el Ejemplo 3, la evaluación se llevó a cabo por el

método fluorogénico y el ensayo TG como se describe en la sección Material y Método. Los resultados se presentan en la Tabla 5 siguiente. En este experimento, los valores de generación de trombina en el material de carga estuvieron en el intervalo de 251-292 nM.

5

Tabla 5- El efecto del nivel de temperatura de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de un intercambiador catiónico para eliminar FXIa.

10

Nivel de temperatura del material de carga (°C)	FXIa (ng/ml)		Eliminación de FXIa (%)*	Trombina (nM) Usando el ensayo TG	
	Usando un método fluorogénico			No unida	
	Carga	No unida			
7	283.9	39.0	86.26	24.9	
15	22±2	283.5	45.1	84.09	25.2
	37	274.2	49.2	82.05	59.7

* Calculado comparando los niveles de FXIa antes ("carga") y después ("no unida") sometiendo la solución a la columna.

20

Los resultados obtenidos muestran que todos los niveles de temperatura probados dieron como resultado la eliminación de FXIa de la solución de inmunoglobulina (en comparación con el material de carga), siendo la temperatura óptima desde la temperatura ambiente (22 ± 2° C) hasta 7° C.

25

Ejemplo 5: El efecto de llevar a cabo un segundo paso de cromatografía de intercambio catiónico sobre la eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina.

30

El siguiente experimento examina si llevar a cabo un segundo paso de cromatografía de intercambio catiónico aumentaría aún más la eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina. La solución de inmunoglobulina de partida usada fue como en el Ejemplo 2. En el siguiente experimento, se sometió un volumen de 2600 ml de la solución a una cápsula Mustang® S que tenía un MV de 10 ml (Pall; número de catálogo CLM05MSTGSP1); el pH de la solución cargada se ajustó a 4,2; y la filtración se llevó a cabo a temperatura ambiente (22 ± 2° C) a un caudal de 30 ml/min (=3 MV/min). La temperatura de la solución cargada fue de 22 ± 2° C.

35

Se recogieron seis fracciones de filtrado (400 ml por fracción) y se midió el nivel de FXIa usando el ensayo TG como se describe en la sección de Materiales y Métodos. En el paso siguiente, se recogieron las seis fracciones de filtrado, se agruparon y se sometieron a un segundo paso de filtración a través de una nueva cápsula Mustang® S (MV = 10 ml). De nuevo, se recogieron seis fracciones de filtrado (400 ml por fracción) y se midió el nivel de FXIa usando el ensayo TG. Los resultados del material de carga y cada fracción de filtrado (1-6) en cada paso de filtración se resumen en la Tabla 6 siguiente. Además, para estimar la recuperación de IgG, se midió la recuperación total de proteínas después del segundo paso de cromatografía de intercambio catiónico.

40

Tabla 6- El efecto de llevar a cabo un segundo paso de cromatografía de intercambio catiónico sobre la eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina.

45

Primera Filtración de Cápsula		
Muestra	Trombina (nM) Usando el ensayo TG	
Material de carga	248.6	
Fracción no unida (UB) 1	0.0	
55	Fracción UB 2	15.2
	Fracción UB 3	40.0
	Fracción UB 4	62.5
60	Fracción UB 5	84.8
	Fracción UB 6	121.5
Segunda Filtración de Cápsula		
65	Material de carga	74.9

(continuación)

5	Fracción UB 1	0.3
	Fracción UB 2	0.0
	Fracción UB 3	0.0
10	Fracción UB 4	2.1
	Fracción UB 5	0.0
	Fracción UB 6	0.0

15 Se observó que llevar a cabo un segundo paso de filtración dio como resultado una eliminación de FXIa aumentada de la solución de inmunoglobulina en comparación con llevar a cabo un solo paso de filtración. También se muestra que la segunda filtración no alteró la alta recuperación de IgG (se obtuvo una recuperación de proteínas total del 91,6% después del segundo paso de filtración).

20 Estos resultados indican que para obtener la eliminación máxima de FXIa de la solución de inmunoglobulina mientras se preservan sustancialmente los niveles de IgG, la solución puede someterse a un intercambiador catiónico más de una vez.

25 **Ejemplo 6: La eficacia de una cromatografía en columna de afinidad para eliminar FXIa de una solución de inmunoglobulina.**

30 En los Ejemplos 1-5 se demostró que una cromatografía de intercambio catiónico era un paso efectivo para eliminar FXIa de una solución de inmunoglobulina en un intervalo de pH de 3,8 a menos de 6. En el siguiente ejemplo, se examinó la eficacia de una cromatografía en columna de afinidad en la eliminación de FXIa. Se usó la columna de benzamidina sefarosa (la benzamidina sefarosa se une a las serina proteasas como FXIa) como columna de afinidad.

35 Con este propósito, se preparó una solución de inmunoglobulina de acuerdo con el paso a-c como se describe en la sección de Materiales y Métodos. En el siguiente paso, la solución se sometió a la columna de afinidad. Se emplearon las siguientes condiciones en la cromatografía de afinidad: se cargaron 120 ml de solución a la columna; el proceso se realizó a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$); el pH de la solución de inmunoglobulina fue de 7,4; se usó un caudal de fluido de 1,3 ml/min; la temperatura de la solución sometida fue de $22 \pm 2^\circ \text{C}$. La columna se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante: se montaron 5 ml de benzamidina sefarosa (GE healthcare número de catálogo 17-5123-01) dentro de una columna de 1 cm de diámetro (Bio-Rad). Antes de su uso, la columna se lavó con 5 CV de agua purificada y se equilibró con 5 CV de tampón (citrato 50 mM y NaCl 0,2 M) con un pH de 7,4.

45 Se recogieron tres muestras de filtrado (40 ml por fracción) y se midió el nivel de FXIa en el material de carga y en la muestra de filtrado usando el método fluorogénico como se ha descrito anteriormente en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados se presentan en la Tabla 7 siguiente.

50 Tabla 7- El efecto de la cromatografía en columna de afinidad de para-amino benzamidina en la eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina.

Muestra	FXIa (ng/ml) Usando un método fluorogénico
Material de carga	363.9
Fracción no unida (UB) 1	90.6
Fracción UB 2	267.1
Fracción UB 3	290.5

60 Se observó que en la primera fracción no unida (UB) la columna era capaz de unirse efectivamente a FXIa. Sin embargo, en la segunda y tercera fracciones UB, se detectó FXIa en cantidades altas en la solución de inmunoglobulina.

65

Estos resultados indican que bajo la condición usada la cromatografía de afinidad con benzamidina sefarosa no es adecuada para eliminar eficazmente FXIa de una solución de inmunoglobulina.

En el experimento anterior se descubrió que en las condiciones probadas la columna de afinidad de benzamidina sefarosa no era eficaz para eliminar FXIa. En el siguiente conjunto de experimentos se probó la cromatografía de afinidad por heparina (se probó la heparina debido a su capacidad para unirse a FXI y FXIa). En este experimento, se evaluó el efecto de diferentes niveles de pH de la solución de inmunoglobulina (en el intervalo de 5,3-8).

Con este propósito, se preparó una solución de inmunoglobulina de acuerdo con los pasos (a) a (c) descritos anteriormente en la sección Materiales y Métodos. En el siguiente paso, se ajustó el pH de la solución con NaCl 0,5 N o con NaOH 0,1 N al pH probado deseado y se sometieron 150 ml de cada una de las soluciones de inmunoglobulina con diferente pH a cromatografía de afinidad por heparina.

Preparación de la columna: se montaron 8 ml de resina de heparina Cpto (GE Healthcare) dentro de una columna de 1 cm de diámetro (Bio-Rad) logrando una altura de lecho de 10 cm. La cromatografía se llevó a cabo a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) a un caudal de 2 ml/min. La temperatura de la solución cargada fue de $22 \pm 2^\circ \text{C}$. La columna se equilibró antes de cargar la solución de inmunoglobulina con 40 ml de tampón de citrato 50 mM que tenía un nivel de pH correspondiente al nivel de pH de la solución de inmunoglobulina a cargar (es decir, un nivel de pH de 5,3, 6,5, 7,4 y 8)

Se recogieron cuatro fracciones de filtrado (40 ml por fracción) y se evaluó el nivel de FXIa en el material de carga y en las fracciones de filtrado usando el método fluorogénico como se ha descrito anteriormente. Los resultados se presentan en la Tabla 8 siguiente.

Tabla 8- El efecto de la cromatografía de afinidad por heparina llevada a cabo a diferentes niveles de pH de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia para eliminar FXIa de la solución.

Nivel de pH del material de carga	Muestra	FXIa (ng/ml) Usando un método fluorogénico
5.3*	Carga	192.87
	Fracción no unida (UB) 1	25.51
	Fracción UB 2	28.92
	Fracción UB 3	40.85
	Fracción UB 4	201.48
6.5	Carga	201.8
	Fracción no unida (UB) 1	38.7
	Fracción UB 2	47.9
	Fracción UB 3	55.2
	Fracción UB 4	190.4
7.4	Carga	214.2
	Fracción UB 1	51.0
	Fracción UB 2	64.6
	Fracción UB 3	107.0
	Fracción UB 4	159.6
8	Carga	209.9
	Fracción UB 1	65.4
	Fracción UB 2	78.7
	Fracción UB 3	112.7
	Fracción UB 4	167.0

* En pH 5,3 se usaron las siguientes condiciones (en lugar de las condiciones especificadas para el resto de los niveles de pH): se usaron 8 ml de Heparin-Hyper DM (GE Healthcare Life Sciences); y el volumen de carga fue de 125 ml. El equilibrio antes de la carga se realizó con 40 ml de tampón (que contenía citrato 50 mM y NaCl 0,2 M a pH 7,4) a un caudal de fluido de 2 ml/min.

En general, se observó que la unión de FXIa a la resina de heparina mejoró al disminuir el pH de la solución de inmunoglobulina. Los mejores resultados se observaron en las tres primeras fracciones no unidas del pH más bajo (5,3). Sin embargo, después de aproximadamente 15 volúmenes de columna, se recoge FXIa en el filtrado (se observó una cantidad relativamente alta de FXIa en las fracciones UB 4 de pH 5,3).

Ejemplo 7: El efecto del nivel de pH de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de una cromatografía de intercambio aniónico para eliminar PKA de la solución.

El siguiente experimento estaba dirigido a determinar el efecto del nivel de pH de una solución de inmunoglobulina sobre la eliminación de PKA de la solución mediante un intercambiador aniónico.

En este experimento se evaluó el efecto de un intervalo de nivel de pH de 6,4-8,2. El nivel de pH de la solución se midió usando un dispositivo electrónico de monitorización de pH.

Se usó la columna DEAE (Toyopearl DEAE-650M; TOSOHAAAS) como intercambiador aniónico. Se usaron 11 ml de resina. El diámetro de la columna era de 1 cm, y se usó una altura de lecho de 14 cm.

En este experimento, se usó una solución de inmunoglobulina preparada a partir de la pasta II y sometida a filtración CUNO de la manera descrita en la sección Materiales y Métodos (una solución de inmunoglobulina después del paso b). En el paso siguiente, el nivel de pH de la solución se ajustó con HCl 0,5 N o NaOH 0,5 N al nivel de pH probado deseado (un intervalo de pH de 6,4-8,2) y 200 ml de cada una de las soluciones de inmunoglobulina resultantes se sometieron a cromatografía de intercambio aniónico (paso c de la preparación de la solución de inmunoglobulina descrita en la sección Materiales y métodos) (en todos los experimentos se sometieron 200 ml que contenían aproximadamente 70 mg/ml de proteína a la cromatografía de intercambio aniónico). El paso de cromatografía se llevó a cabo a 8° C; la temperatura de la solución de inmunoglobulina cargada fue de 8° C; y se usó un caudal de fluido lineal de 1,65 ml/min/cm².

En los ejemplos 7 a 11, se usó la misma solución de inmunoglobulina como material de carga ("Carga"), es decir, el nivel de PKA del material de carga fue idéntico en todos los experimentos.

El nivel de PKA y otras características de la solución de inmunoglobulina, como la recuperación total de proteínas, la distribución de subclases de IgG, los niveles de títulos de anticuerpos anti-HBsAg y anti-difteria se evaluaron en la fracción "no unida" (=después de someter las soluciones al intercambiador aniónico). Las evaluaciones se llevaron a cabo como se describe en la sección Materiales y métodos. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9- El efecto del nivel de pH de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de la columna DEAE para eliminar PKA.

Nivel de pH del material de carga	Recuperación de proteínas total** (%)	Anti-HBsAg (mIU/ml)	PKA (IU/ml)	Distribución de subclases de IgG (%)				Anticuerpos Anti-Difteria (IU/ml)
				IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	
6.4	97	4762	14.4	ND	ND	ND	ND	ND
7.0	97	4884	<LOQ	62.9	29.5	6.7	0.9	6.1
7.6	95	3450	<LOQ	63.6	28.8	6.6	1.0	5.8
8.2	97	2481	<LOQ	64.7	28.7	5.7	0.9	5.3

* ND: no determinado; LOQ- límite de cuantificación-un valor de <6.
 ** La recuperación total de proteínas (%) se calculó comparando el contenido de proteínas (usando el método de Biuret) antes y después de someter la solución a la columna.

Se observó que un nivel de pH bajo de 6,4 dio como resultado un contenido de PKA aumentado en la solución de IgG recuperada en comparación con los niveles de pH más altos. También se observó que un nivel de pH en el intervalo de 7-8,2 (un intervalo en el que la PKA tiene una carga eléctrica neta cero y, como tal, no se espera que se una a grupos con carga positiva) dio como resultado una mayor capacidad del intercambiador aniónico para eliminar PKA (el nivel de PKA estaba por debajo del límite de cuantificación). Los resultados también muestran que un intervalo de nivel de pH de 7-8., también dio como resultado altas recuperaciones de proteínas en la fracción no unida (un nivel de pH en el que la IgG tiene una carga neta cero o negativa y se esperaba que parte de ella estuviera unida al intercambiador aniónico) (se obtuvieron recuperaciones de proteínas en el intervalo del 95-100%), en las características de distribución de subclases de IgG no alteradas [distribución de subclases de IgG típica (IgG1- aproximadamente el 65%, IgG2- aproximadamente el 30%, IgG3- aproximadamente el 6%, e IgG4-

aproximadamente el 1%), y títulos de anticuerpos anti-HBsAg (en el intervalo de 2000-5000 mIU/ml) y anti-difteria (aproximadamente 6 IU/ml) típicos].

Estos resultados indican que la solución de inmunoglobulina debe tener un intervalo de nivel de pH de 7 a 8,2 mientras se somete al intercambiador aniónico para eliminar eficazmente PKA de la solución.

Ejemplo 8: El efecto del nivel de temperatura sobre la eliminación de PKA de una solución de inmunoglobulina por cromatografía de intercambio aniónico.

El siguiente experimento examina el efecto del nivel de temperatura de una solución de inmunoglobulina sobre la eliminación de PKA de la solución por un intercambiador aniónico. Se evaluaron soluciones de inmunoglobulina equilibradas a las siguientes temperaturas: 2, 8, 14 y 20° C. La solución de inmunoglobulina inicial (material de carga) usada y una columna DEAE se usaron como en el Ejemplo 7. El paso de cromatografía en sí mismo se llevó a cabo a 8° C; se usaron un caudal de fluido lineal de 1,65 ml/min/cm² y un nivel de pH de 7,5; y el volumen de carga fue de 200 ml. Se evaluaron el nivel de PKA y otras características de la solución de inmunoglobulina (los mismos parámetros que anteriormente) en la fracción no unida. Los resultados se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10- El efecto de la temperatura de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de la columna DEAE para eliminar PKA.

Nivel de temperatura del material de carga	Recuperación de proteínas total (%)	PKA (IU/ml)	Anti-HBsAg (mIU/ml)	Distribución de subclases de IgG (%)				Anticuerpos Anti-Difteria (IU/ml)
				IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	
2	100	7.7	4616	ND	ND	ND	ND	ND
8	96	<LOQ	3222	65.4	27.0	6.5	1.1	6.4
14	97	<LOQ	3620	65.0	27.8	6.3	1.0	6.4
20	100	<LOQ	4970	64.1	27.8	7.0	1.1	6.4

* ND- no determinado LOQ- límite de cuantificación – un valor de <6.

Se descubrió que una solución de IgG cargada que tenía una temperatura baja de 2°C dio como resultado un contenido de PKA aumentado en la fracción no unida recuperada. Una temperatura en el intervalo de 8 a 20° C dio como resultado una eliminación óptima de PKA (el nivel de PKA estaba por debajo del límite de cuantificación), con contenido de IgG inalterado y características de distribución de subclases de IgG después del paso de cromatografía DEAE, y títulos de anticuerpos anti-HBsAg y anti-difteria típicos (ver valores típicos arriba).

Ejemplo 9: El efecto del volumen de carga de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de una cromatografía de intercambio aniónico para eliminar PKA.

El siguiente experimento examina el efecto del volumen de carga de una solución de inmunoglobulina sobre la eliminación de PKA de la solución por un intercambiador aniónico. Los siguientes volúmenes se cargaron en la columna: volumen de 12 columnas (CV), 20 CV y 25 CV (el volumen de la resina y los premasters de la columna son como en el Ejemplo 7). Por "volumen de 12 columnas" se entiende 12 veces el volumen de la resina (que era de 11 ml).

La solución de inmunoglobulina inicial (material de carga) usada fue como en el Ejemplo 7 y se usó una columna DEAE como intercambiador aniónico. El paso de cromatografía se llevó a cabo a 8° C; de acuerdo con los ejemplos anteriores, la temperatura de la solución de inmunoglobulina cargada fue de 8° C y el pH fue de 7,5; y se usó un caudal de fluido lineal de 1,65 ml/min/cm².

Se evaluaron el nivel de PKA y otras características de la solución de inmunoglobulina (los mismos parámetros que anteriormente) en la fracción no unida. Los resultados se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11- El efecto de aumentar los volúmenes de carga de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de una columna DEAE para eliminar PKA.

Volumen de carga (CV)	Recuperación de proteínas total (%)	PKA (IU/ml)	Anti-HBsAg (mIU/ml)	Distribución de subclases de IgG (%)				Anti-Difteria (IU/ml)
				IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	
12	100	<LOQ	5107	63.2	29.2	6.6	1.0	6.5
20	93	<LOQ	3727	64.8	27.9	6.4	0.9	6.4
25	99	<LOQ	5329	66.6	26.0	6.4	1.1	6.1

* LOQ- límite de cuantificación – un valor de <6.

Los resultados muestran que en todos los volúmenes de carga probados, la columna DEAE eliminó eficientemente el PKA sustancialmente sin afectar a las recuperaciones de proteínas (se obtuvo una recuperación de proteínas total en el intervalo del 93-100%), características de IgG (todos los valores son comparables a los valores típicos o títulos anti-difteria y anti-HBsAg (ver los valores típicos en el ejemplo 7).

Ejemplo 10: El efecto de la velocidad lineal de la solución de inmunoglobulina cuando se somete a una cromatografía de intercambio aniónico sobre la eficacia de la cromatografía para eliminar PKA.

El siguiente ejemplo examina el efecto de la velocidad lineal de la solución durante la carga sobre la eficacia de la cromatografía de intercambio aniónico para eliminar la PKA. Se evaluaron las siguientes velocidades lineales: 1, 2, 3 y 4 cm/min/ml.

El material de carga usado y la columna DEAE usada fueron como en el Ejemplo 7. El paso de cromatografía se llevó a cabo a 8° C; la temperatura de la solución de inmunoglobulina cargada fue de 8° C; se usó un pH de 7,5; y el volumen de carga fue de 200 ml.

Se evaluaron el nivel de PKA y otras características de la solución de inmunoglobulina (igual que anteriormente) en el material no unido. Los resultados se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12- El efecto de la velocidad lineal de una solución de inmunoglobulina sobre la eficacia de una columna DEAE para eliminar PKA.

Velocidad lineal del material de carga (cm/min/ml)	Recuperación de proteínas total (%)	Anti-HBsAg (mIU/ml)	PKA (IU/ml)	Distribución de subclases de IgG (%)				Anticuerpos Anti-Difteria (IU/ml)
				IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	
1	97	3870	<LOQ	65.5	27.4	6.1	1.0	5.3
2	96	3844	<LOQ	65.5	27.0	6.4	1.1	5.2
3	98	3739	11.2	ND	ND	ND	ND	ND
4	101	3751	8.6	ND	ND	ND	ND	ND

* ND- no determinado; LOQ- límite de cuantificación – un valor de <6.

Los resultados muestran que una velocidad lineal entre 1 y 2 cm/min/ml eliminó eficientemente la PKA de la solución de inmunoglobulina sin afectar a la recuperación de proteínas o las características de IgG. Velocidades lineales más altas (por ejemplo, 3-4 cm/min/ml) dieron como resultado una eliminación de PKA más baja.

Ejemplo 11: Eliminación de agentes trombogénicos de una solución de inmunoglobulina usando cromatografía de intercambio iónico en tándem.

Se preparó una solución de inmunoglobulina a partir de la pasta II y se sometió a filtración CUNO de la manera descrita en la sección Materiales y Métodos (una solución de inmunoglobulina después del paso b). En el paso siguiente, la solución se sometió a una columna DEAE [(Toyopearl DEAE-650M; TOSHAAS) (se usaron 11 ml de resina; el diámetro de la columna fue de 1 cm y se usó una altura de lecho de 14 cm)] bajo las condiciones

siguientes: el paso de cromatografía se llevó a cabo a 8° C; la temperatura de la solución de inmunoglobulina cargada fue de 8° C; un caudal de fluido lineal de 1,65 ml/min/cm²; y el nivel de pH de la solución de inmunoglobulina cargada se equilibró a 7,5. El volumen de la solución cargada fue de 200 ml. La columna se equilibró antes de cargar la solución como se describe en la sección Materiales y Métodos. El nivel de PKA y otras características de la solución de inmunoglobulina (como anteriormente) se evaluaron en la fracción "no unida" (=después de someter las soluciones al intercambiador aniónico). Las mediciones se llevaron a cabo como se describe en la sección Materiales y Métodos. Los resultados se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13- Eliminación de PKA de una solución de inmunoglobulina por un intercambiador aniónico.

PKA (IU/ml)	Recuperaciones de Proteínas Totales (%)	Anti-HBsAg (mIU/ml)	Subclases de IgG (%)				Anti-Difteria (IU/ml) *
			IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	
<LOQ	100	4332	63.6	28.9	6.6	0.9	6.7

LOQ- límite de cuantificación – un valor de <6.

Los resultados muestran que, bajo las condiciones usadas, la columna DEAE eliminó eficazmente PKA sustancialmente sin afectar a la recuperación de proteínas (se obtuvo una recuperación total de proteínas de 100), las características de IgG (todos los valores son comparables a los valores típicos), títulos anti-difteria y anti-HBsAg (ver los valores típicos en el Ejemplo 7).

Después de poner en contacto la solución de inmunoglobulina con el intercambiador aniónico, la fracción no unida recogida se somete a los pasos d)-e) de la preparación de inmunoglobulina como se describe en la sección Material y Métodos. En el paso siguiente, la solución se somete a un intercambiador catiónico bajo las siguientes condiciones: un nivel de pH en el intervalo de 3,8 a 6; un caudal inferior a 2,5 ml/min [por ejemplo, un caudal en el intervalo de 0,7 a 1,5 ml/min (2-4,3 MV/min)]; y la temperatura de la composición de inmunoglobulina cargada está en el intervalo de temperatura ambiente (22 ± 2° C) a 7° C.

La eliminación de FXIa se evalúa en el material de carga ("Carga") y después de recoger la solución de la columna ("No unida"). La medición se lleva a cabo mediante el ensayo TG y/o mediante el método fluorogénico como se describe en la sección Materiales y Métodos.

Ejemplo 12: El efecto de la columna SDR sobre la eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina.

El siguiente experimento estaba dirigido a determinar la capacidad de la columna SDR para eliminar FXIa de una solución de inmunoglobulina.

Con este propósito, se preparó una solución de inmunoglobulina a partir de la pasta II de acuerdo con el paso a)-e) de la manera descrita en la sección Materiales y Métodos. En el paso siguiente, la solución se sometió a una cromatografía de intercambio catiónico usando la cápsula Mustang® S de la siguiente manera (condiciones de aumento progresivo):

Antes de someter la solución de inmunoglobulina al intercambiador catiónico, la solución se filtró a través de un filtro CA de 0,2 µm obtenido de Corning (para reducir los agregados). La filtración Mustang® se realizó a través de dos filtros Mustang® S que se conectaron en serie. Antes de la filtración Mustang®, los dos filtros se lavaron por separado con 30 Kg de NaOH 1 N a un caudal de 2,1 l/min (para ambos filtros). Como segundo lavado, ambos filtros se lavaron por separado con 50 Kg de NaCl 1 N a un caudal de 1,8 l/min (para el primer filtro) o a un caudal de 2,1 l/min (para el segundo filtro). Finalmente, los filtros se lavaron por separado con 50 Kg de acetato de sodio 20 mM (a un pH de 4,2) a un caudal de 1,8 l/min (para el primer filtro) o a un caudal de 1,9 l/min (para el segundo filtro). Los lavados anteriores se llevaron a cabo para obtener un nivel de pH de 4,2. Todos los lavados se llevaron a cabo a una presión de 0.

Filtración Mustang®: la solución de inmunoglobulina se filtró a través de los dos filtros Mustang® S lavados a un caudal de 1,6 l/min. Se recogió un total de 160 kg de solución de inmunoglobulina (fracción no unida). La temperatura de la solución cargada fue de 7° C mientras que el filtro estaba a temperatura ambiente. El pH de la solución de inmunoglobulina cargada fue 4,2-4,3.

En el paso siguiente, el filtrado (fracción no unida) se sometió a tratamiento con solvente/detergente (S/D) y columna SDR como se describe en la sección Materiales y Métodos.

Se midió el nivel de FXIa en la solución antes de filtrar la solución a través de la membrana Mustang S (es decir, una solución de inmunoglobulina preparada de acuerdo con el paso a-e) como se describe en la sección Material y Métodos), después de filtrar la solución a través de la membrana Mustang S, y después de someter las soluciones a tratamiento S/D + columna SDR.

La evaluación se llevó a cabo mediante un método fluorogénico como se describe en la sección Materiales y Métodos. Los resultados se presentan en la Tabla 14 siguiente.

Tabla 14-Eliminación de FXIa de una solución de inmunoglobulina por columna SDR.

Muestra probada	FXIa (ng/ml)
	Usando un método fluorogénico
Filtración Pre-Mustang S	529.4
Filtración Post-Mustang S	37.6
Tratamiento Post SD+ columna SDR	3.9 (<LOD)
* LOD- límite de detección	

Como se muestra en la Tabla 14, la adición del tratamiento S/D y el paso de eliminación de S/D por columna SDR da como resultado la eliminación de cantidades residuales de FXIa.

Ejemplo 13: Eliminación de calicreína de una solución de inmunoglobulina usando la cápsula Mustang® S (un intercambiador catiónico).

El siguiente experimento estaba dirigido a determinar la capacidad de la cápsula Mustang® para eliminar la calicreína de una solución de inmunoglobulina.

Con este propósito, se preparó una solución de inmunoglobulina a partir de la pasta II de acuerdo con los pasos (a)-(e) de la manera descrita en la sección Materiales y Métodos. En el paso siguiente, la solución se sometió a la cápsula Mustang® S de la siguiente manera (condiciones de aumento progresivo):

Antes de la filtración Mustang®, cada filtro se pre-lavó por separado con por lo menos 30 Kg de NaOH 1 N a un caudal de 1,6-2,3 l/min. Como segundo lavado, cada filtro se lavó por separado con por lo menos 50 Kg de NaCl 1 N a un caudal de 1,6-2,3 l/min. Finalmente, cada filtro se equilibró por separado con 50 Kg de acetato de sodio 20 mM (a un pH de 4,2) a un caudal de 1,6-2,3 l/min. Los lavados anteriores se llevaron a cabo para obtener un nivel de pH de 4,2. Todos los lavados se llevaron a cabo a una presión de ≤ 1 bar.

Antes de someter la solución de inmunoglobulina al intercambiador catiónico, la solución se filtró a través de un filtro Durapore de 0,2 μ m (Milipore) (para reducir los agregados). La solución de inmunoglobulina resultante se filtró a través de dos cápsulas Mustang® S (que se pre-lavaron y se equilibraron como se ha especificado anteriormente) que se conectaron en serie.

Filtración Mustang®: la solución de inmunoglobulina se filtró a través de las dos cápsulas a un caudal de 1,6 a 2,3 l/min [se cargaron aproximadamente 160 kg (aproximadamente 160 l) de solución de inmunoglobulina; y aproximadamente 70 mg/ml de proteína]. Se recogió un total de aproximadamente 160 kg de solución de inmunoglobulina (aproximadamente 160 l) (fracción no unida).

La temperatura de la solución cargada fue de aproximadamente 7° C mientras que el filtro estaba a temperatura ambiente; la filtración se llevó a cabo a temperatura ambiente; el pH de la solución de inmunoglobulina cargada fue de 4,1-4,3.

El nivel de eliminación de calicreína se midió en la solución de inmunoglobulina antes ("pre-filtración") y después de la filtración ("post-filtración") a través de la cápsula Mustang® S, y se calculó el porcentaje de eliminación de calicreína. La evaluación se llevó a cabo mediante un método cromogénico como se describe en la sección Materiales y Métodos.

Para estimar la recuperación de IgG después de la filtración, se midió la recuperación de proteínas total (%)

La eliminación de calicreína obtenida se muestra en la Tabla 15 siguiente, y la recuperación de proteínas total obtenida (%) se muestra en la Tabla 16.

Tabla 15- Eliminación de calicreína mediante filtros Mustang® S.

Muestra	V_{max}^*	Calicreína (ng/ml)	Eliminación (%)
Pre-filtración	478.2	3760.6	
Post-filtración	20.6	126.1	97%

Tabla 16- Recuperación de proteínas después de la filtración Mustang® S.

Proteína de la muestra	Proteína totales (mg/ml)	Recuperación de Proteína (%)
Pre-filtración	65.4	
Post-filtración	63.4	97%

5

10

Se observó que, bajo las condiciones especificadas, la carga de una solución de inmunoglobulina en un intercambiador catiónico dio como resultado la eliminación del 97% de caliceína, mientras que se recuperó el 97% de la proteína (IgG).

15

Ejemplo 14: Verificación de la actividad inductora de trombosis de una solución de inmunoglobulina preparada de acuerdo con la invención en un modelo in vivo.

20

El siguiente experimento estaba dirigido a examinar si una solución de inmunoglobulina que se sometía a eliminación de caliceína, PKA y/o FXIa como en los ejemplos anteriores muestra actividad inductora de trombosis reducida. La evaluación se llevó a cabo usando un modelo in vivo como se describe en Wessler et al. (Biologic assay of a thrombosis-inducing activity in human serum. J Appl Physiol. 1959;14:943-946).

25

Se observó, usando el modelo animal de Wessler, que una solución de inmunoglobulina sometida a eliminación de PKA y/o FXIa de acuerdo con la invención mostraba una actividad inductora de trombosis reducida.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para eliminar el activador de precalicreína y un agente trombogénico seleccionado de Factor XI y/o Factor XIa de una solución que contiene inmunoglobulina, el método comprendiendo los pasos de:
- 10 (a) eliminar el Factor XI y/o el Factor XIa poniendo en contacto la solución que contiene inmunoglobulina a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3 con un soporte que comprende grupos cargados negativamente inmovilizados para permitir la unión del Factor XI y/o Factor XIa; y recoger una fracción no unida que comprende IgG; y
- 15 (b) eliminar el activador de precalicreína poniendo en contacto la solución que contiene inmunoglobulina a un pH en el intervalo de 7 a 8,2 con un soporte que comprende grupos cargados positivamente inmovilizados para permitir la unión del activador de la precalicreína; y recoger una fracción no unida que comprende IgG;
- 20 en donde el método emplea el paso (a) seguido del paso (b) o el paso (b) seguido del paso (a).
- 25 **2.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución en el paso (a) tiene un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,0, opcionalmente en el intervalo de igual o más de 4,0 a igual o menos de 5,0, opcionalmente en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 4,7, opcionalmente en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 4,3, opcionalmente en el intervalo de igual o más de 4,0 a igual o menos de 4,3, u opcionalmente en el intervalo de igual o más de 4,1 a igual o menos de 4,3.
- 30 **3.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución en el paso (a) tiene un pH de 4,0 a 4,3.
- 35 **4.** El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución en el paso (a) tiene un pH de 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6 o 4,7.
- 40 **5.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paso (a) comprende además un segundo paso de poner en contacto la solución que contiene inmunoglobulina con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados bajo el mismo pH; y recoger una fracción no unida que comprende la IgG.
- 45 **6.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el soporte usado en el paso (a) está en forma de un material cromatográfico o una membrana cromatográfica.
- 50 **7.** El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el material de soporte o membrana usado en el paso (a) es hidrófilo y se selecciona del grupo que consiste de agarosa, sefarosa, perlas acrílicas, celulosa, vidrio de poro controlado, geles de sílice y dextranos; hidrófobo y seleccionado del grupo que consiste de resinas; o polímero sintético orgánico seleccionado del grupo que consiste de materiales o membranas a base de poliacrilamidas o poliestirenos.
- 55 **8.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los grupos cargados negativamente se inmovilizan al soporte a través de un conector presente entre el soporte y los grupos cargados negativamente, opcionalmente en el que el conector se selecciona del grupo que consiste de una proteína, amino ácido y péptido.
- 60 **9.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los grupos cargados negativamente inmovilizados se seleccionan del grupo que consiste de derivados de ácidos sulfónicos y otros ácidos que contienen azufre, ácidos fórmicos y otros ácidos carboxílicos, ácidos fosfóricos y otros ácidos que contienen fósforo, nitrato y otros ácidos que contienen nitrógeno, y una combinación de los mismos.
- 65 **10.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde los grupos cargados positivamente inmovilizados se seleccionan del grupo que consiste de amonio, alquilamonio, dialquilamonio, trialquilamonio, amonio cuaternario, grupos alquilo, H⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, grupo funcional amino, y una combinación de los mismos, preferiblemente en donde los grupos cargados positivamente inmovilizados son amonio cuaternario, preferiblemente en donde el amonio cuaternario es dietilaminoetil (DEAE).
- 11.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el método comprende poner en contacto la solución con el soporte que comprende los grupos cargados positivamente inmovilizados a un pH en el intervalo de 7 a 8,2; recoger una fracción no unida; ajustar el pH de la fracción no unida a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3; poner en contacto la fracción no unida con el soporte que comprende los grupos cargados negativamente inmovilizados a un pH en el intervalo de más de 3,8 a igual o menos de 5,3; y recoger una fracción no unida.
- 12.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que poner en contacto la solución con el soporte que comprende los grupos cargados positivamente se lleva a cabo a una velocidad lineal en el intervalo de 1 a 2 ml/min/cm², y en el que la inmunoglobulina que contiene la solución tiene una temperatura en el intervalo de

2 a 22° C.

5 **13.** El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además el paso de: (c) poner en contacto la solución que contiene inmunoglobulina con un material cromatográfico que comprende polímero acrílico hidrófobo reticulado tridimensional; y recoger una fracción no unida que comprende la IgG.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65