

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 396**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 1/18</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/06</b>	(2006.01)
<b>B01D 15/36</b>	(2006.01)
<b>B01D 15/16</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/18</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>B01D 15/42</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/028953**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144511**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14721128 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2970377**

54 Título: **Métodos para producir una preparación de IgG derivadas de plasma humano enriquecida en IgG naturales relacionadas con enfermedad cerebral**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361794378 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.05.2020**

73 Titular/es:

**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)  
1200 Lakeside Drive  
Bannockburn, IL 60015, US y  
BAXALTA GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GNAUER, LUCIA;  
BUTTERWECK, HARALD ARNO;  
BAUER, THERESA;  
WEBER, ALFRED;  
TESCHNER, WOLFGANG y  
SCHWARZ, HANS-PETER**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 763 396 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para producir una preparación de IgG derivadas de plasma humano enriquecida en IgG naturales relacionadas con enfermedad cerebral

5

**Antecedentes de la invención**

La enfermedad de Alzheimer es una forma común de demencia relacionada con la edad que provoca la pérdida gradual de la función cognitiva, incluida la memoria y las capacidades de pensamiento crítico. La enfermedad de Alzheimer se diagnostica clínicamente mediante un hallazgo de pérdida progresiva de memoria y disminución de las capacidades cognitivas. Sin embargo, la confirmación de la enfermedad de Alzheimer no se produce hasta después del fallecimiento.

10

La enfermedad de Alzheimer es cada vez más frecuente en los países desarrollados, donde se ha producido un aumento de la población de ancianos debido en parte a la mejora de la atención sanitaria. Aunque menos del 1% de la población menor de 60 años se ve afectada por el Alzheimer, se estima que entre el 25% y el 33% de las personas desarrollan alguna forma de Alzheimer a la edad de 85 años. A partir de 2012, a 5,4 millones de estadounidenses se les diagnosticó Alzheimer. A medida que continúe aumentando la esperanza de vida en todo el mundo, la prevalencia de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias asociadas a la edad probablemente también continúe creciendo.

15

20

Histopatológicamente, esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por la formación de placas de amiloide, ovillos neurofibrilares, angiopatía amiloide y degeneración granulovacuolar en la corteza cerebral (Mirra *et al.*, Arch Pathol Lab Med., 117:132-144 (1993); Perl DP, Neurol Clin., 18: 847-864 (2000)). Las placas de amiloide características, usadas para confirmar la enfermedad de Alzheimer en la autopsia, se forman en gran medida por la deposición de un pequeño péptido beta-amiloide (A $\beta$ ) derivado de la proteína precursora de amiloide (APP).

25

Hasta la fecha, la Administración de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) ha aprobado dos tipos de medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer: inhibidores de la colinesterasa, incluyendo Aricept® (donepezilo), Exelon (rivastigmina) Razadyne (galantamina) y Cognex (tacrina); y el inhibidor del receptor de glutamato de tipo NMDA memantina (comercializado con varias marcas diferentes). Aunque no se ha identificado una cura para la enfermedad de Alzheimer, estas terapias sirven para aliviar los síntomas cognitivos, tales como pérdida de memoria, confusión y pérdida de las capacidades de pensamiento crítico en sujetos a los que se les diagnostica demencia relacionada con la edad (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer). En total, se estima que el gasto en atención sanitaria en la enfermedad de Alzheimer y las demencias asociadas a la edad relacionadas en 2012 será de 200 mil millones de \$ sólo en los Estados Unidos (Factsheet, Alzheimer's Association, marzo de 2012).

30

35

Además de estas terapias aprobadas, varios estudios han sugerido que la inmunoglobulina intravenosa (IGIV) agrupada es eficaz para retrasar la progresión de los síntomas en pacientes con Alzheimer (Dodel RC *et al.*, J Neurol Neurosurg Psychiatry, Oct; 75(10):1472-4 (2004); Magga J. *et al.*, J Neuroinflammation, 7 de diciembre; 7:90 (1997); Relkin NR *et al.*, Neurobiol Aging, 30(11):1728-36 (2008); Puli L. *et al.*, J Neuroinflammation 29 de mayo; 9:105 (2012)).

40

Desde hace tiempo se reconoce que el plasma humano contiene anticuerpos anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ). Por ejemplo, se ha detectado actividad de anticuerpos anti-A $\beta$  en la sangre de adultos normales de diversas edades y pacientes con enfermedad de Alzheimer (Weksler *et al.*, Exp Gerontol., 37:943-948 (2002); Hyman *et al.*, Ann Neurol., 49:808-810.5 (2001); Mruthinti *et al.*, Neurobiol Aging., 25:1023-1032 (2004); Nath *et al.*, Neuromolecular Med., 3:29-39 (2003); y Sohn *et al.*, Frontiers in Bioscience., 14:3879-3883 (2009)). Debido a que el plegamiento erróneo y la agregación de los polipéptidos de A $\beta$  son fundamentales para la patogenia de la enfermedad de Alzheimer, se cree que los anticuerpos anti-A $\beta$  presentes en las preparaciones de IGIV comerciales pueden ser responsables en gran medida de los resultados positivos mostrados en estudios preliminares sobre el tratamiento con la IGIV de los síntomas en pacientes con Alzheimer. Por tanto, es deseable una preparación de IgG derivadas de plasma enriquecida en anticuerpos anti-A $\beta$ .

50

La publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2002/0009445, de Du y Dodel, sugiere que la cromatografía de afinidad de A $\beta$  puede usarse para aislar anticuerpos anti-A $\beta$  del plasma humano. Sin embargo, el plasma humano ya es un recurso limitante en la fabricación de importantes composiciones terapéuticas, tales como la inmunoglobulina G (por ejemplo, IGIV o IgG para administración subcutánea), porque se proporciona a través de donaciones. Por tanto, no pueden asignarse porciones significativas de plasma humano disponible para su uso exclusivo en la fabricación de nuevos productos terapéuticos derivados de plasma con mercados comerciales menos establecidos, tales como la inmunoglobulina G anti-A $\beta$  policlonal. Además, la integración de una nueva etapa de purificación por afinidad en los procesos de fabricación existentes para productos terapéuticos derivados de plasma (por ejemplo, IgG) pueden tener consecuencias imprevistas para el producto terapéutico final o el rendimiento de fabricación. Además de requerir una nueva validación completa y un posible nuevo diseño de los procesos de fabricación de IgG clave, se requeriría una nueva aprobación regulatoria de los procedimientos de fabricación por

65

parte de las agencias reguladoras clave.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de métodos de preparación de composiciones de inmunoglobulina G derivada de plasma enriquecidas en anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, tales como anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y/o anti- $\alpha$ -sinucleína a partir del suministro existente de donaciones de plasma. Ventajosamente, la presente divulgación satisface estas y otras necesidades al proporcionar métodos para fabricar composiciones de IgG enriquecidas en anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral a partir de fracciones producidas durante la fabricación de productos terapéuticos de IgG comerciales, sin alterar y/o modificar el proceso de fabricación subyacente.

### Breve resumen de la invención

La invención se expone según las reivindicaciones adjuntas.

Entre otros aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para la fabricación de composiciones de inmunoglobulina G derivada de plasma altamente enriquecidas para anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína). Ventajosamente, los métodos proporcionados no afectan a los procesos de fabricación ni a las capacidades para producir productos terapéuticos de IgG derivadas de plasma.

Los métodos y las composiciones proporcionados en el presente documento se basan en parte en el sorprendente descubrimiento de que los anticuerpos IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral presentes en el plasma humano (por ejemplo, anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína) se unen a materiales de intercambio catiónico con mayor afinidad que la mayoría de los anticuerpos IgG presentes en el plasma humano. En algunos aspectos, este descubrimiento se aprovecha para proporcionar métodos para aislar anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral que incluyen etapas de unir la IgG total de una fracción de plasma a un material de intercambio catiónico, eluir la mayor parte de la IgG del material de intercambio catiónico en un primer eluato usando un primer tampón de elución, y posteriormente eluir la IgG que permanece unida al material de intercambio catiónico en un segundo eluato usando un segundo tampón de elución, en el que el segundo eluato está enriquecido en anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína).

En otros aspectos, se proporcionan composiciones de IgG derivadas de plasma enriquecidas en anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína), que puede obtenerse mediante los métodos descritos en el presente documento. En otros aspectos, las composiciones de IgG derivadas de plasma enriquecidas en anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína) se usan para el tratamiento de una enfermedad y/o un trastorno cerebral (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o Parkinson).

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un primer método, el primer método para preparar una preparación de inmunoglobulina enriquecida en inmunoglobulinas relacionadas con enfermedad cerebral, incluyendo el método (A) proporcionar una composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG, incluyendo las inmunoglobulinas IgG una inmunoglobulina anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), una inmunoglobulina anti-RAGE, una inmunoglobulina anti- $\alpha$ -sinucleína, u otra inmunoglobulina específica para una proteína relacionada con enfermedad cerebral. El método incluye además (B) unir las inmunoglobulinas IgG a un material de intercambio catiónico. El método incluye además (C) eluir una mayoría de las inmunoglobulinas IgG unidas del material de intercambio catiónico, en una primera etapa de elución de intercambio catiónico, usando un primer tampón de elución de intercambio catiónico que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 3,0 mS/cm a 16,0 mS/cm. El método incluye además (D) eluir inmunoglobulinas IgG que permanecen unidas al material de intercambio catiónico, en una segunda etapa de elución de intercambio catiónico, usando un segundo tampón de elución de intercambio catiónico que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 10,0 mS/cm a 300,0 mS/cm. El método incluye además (E) recuperar un eluato enriquecido en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona un segundo método, el segundo método para preparar una preparación de inmunoglobulina enriquecida en inmunoglobulinas relacionadas con enfermedad cerebral, el método incluye (A) proporcionar una composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG, incluyendo las inmunoglobulinas IgG una inmunoglobulina anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), una inmunoglobulina anti-RAGE, una inmunoglobulina anti- $\alpha$ -sinucleína, u otra inmunoglobulina específica para una proteína relacionada con enfermedad cerebral. El método incluye además (B) unir las inmunoglobulinas IgG a un material de intercambio catiónico débil. El método incluye además (C) eluir una mayoría de las inmunoglobulinas IgG unidas del material de intercambio catiónico, en una primera etapa de elución de intercambio catiónico, usando un primer tampón de elución de intercambio catiónico que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 3,0 mS/cm a 16,0 mS/cm. El método incluye además (D) eluir inmunoglobulinas IgG que permanecen unidas al material de

- intercambio catiónico, en una segunda etapa de elución de intercambio catiónico, usando un segundo tampón de elución de intercambio catiónico que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 80,0 mS/cm a 120,0 mS/cm. El método incluye además (E) recuperar un eluato enriquecido en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas.
- 5 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en (A) incluye una inmunoglobulina anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ).
- 10 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en (A) incluye una inmunoglobulina anti-RAGE.
- En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en (A) incluye una inmunoglobulina anti- $\alpha$ -sinucleína.
- 15 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en (A) incluye una inmunoglobulina específica para una proteína relacionada con enfermedad cerebral seleccionada de proteína priónica principal (PrP), huntingtina (HD), prolactina (PRL), beta2-microglobulina ( $\beta$ 2 M), proteína tau asociada a microtúbulos (tau), ubiquitina (UBB; UBC) y cistatina C (CST3).
- 20 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la enfermedad cerebral es un trastorno cerebral neurodegenerativo.
- En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en (A) tiene un título mayor de una inmunoglobulina anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), una inmunoglobulina anti-RAGE, una inmunoglobulina anti- $\alpha$ -sinucleína, u otra inmunoglobulina específica para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, en comparación con el título de una composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma preparada a partir de una agrupación de plasmas que contiene plasma de 1.000 donantes al azar.
- 25 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el material de intercambio catiónico es un material de intercambio catiónico débil.
- 30 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el material de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico de carboximetilo.
- 35 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el primer tampón de elución de intercambio catiónico tiene un pH de 7,0 a 9,5.
- 40 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el primer tampón de elución de intercambio catiónico tiene un pH de desde 8,0 hasta 9,0.
- En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el primer tampón de elución de intercambio catiónico tiene una conductividad de 4,0 mS/cm a 15,0 mS/cm.
- 45 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el primer tampón de elución de intercambio catiónico tiene una conductividad de 5,0 mS/cm a 8,0 mS/cm.
- En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el primer tampón de elución de intercambio catiónico tiene un pH de  $8,5 \pm 0,2$  y una conductividad de  $5,0 \pm 1$  mS/cm.
- 50 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el segundo tampón de elución de intercambio catiónico tiene un pH de 7,0 a 9,5.
- 55 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el segundo tampón de elución de intercambio catiónico tiene un pH de desde 8,0 hasta 9,0.
- En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el segundo tampón de elución de intercambio catiónico tiene una conductividad de 80 mS/cm a 150 mS/cm.
- 60 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el segundo tampón de elución de intercambio catiónico tiene una conductividad de 80 mS/cm a 120 mS/cm.
- 65 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma se prepara mediante un método que incluye una etapa de precipitación con alcohol.

- 5 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la etapa de precipitación con alcohol incluye la formación de precipitado seleccionado del grupo que consiste en un precipitado de fracción I, un precipitado de fracción II de Cohn, un precipitado de fracción II+III de Cohn, un precipitado de fracción I+II+III de Cohn, un precipitado G, un precipitado A de Kistler-Nitschmann y un precipitado de gammaglobulina de Kistler-Nitschmann.
- En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en la etapa (A) es un precipitado G en suspensión.
- 10 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en la etapa (A) es un sobrenadante de fracción I.
- En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en la etapa (A) es una fracción de plasma que se ha enriquecido mediante al menos una etapa cromatográfica previa.
- 15 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, la al menos una etapa cromatográfica previa es una etapa cromatográfica de intercambio aniónico.
- 20 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, los métodos incluyen además el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico.
- En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico incluye (F) reducir la conductividad del eluato recuperado en la etapa (E) hasta una conductividad final de no más de 15 mS/cm, formándose de ese modo una composición de IgG de conductividad reducida.
- 25 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico incluye cromatografía de intercambio catiónico.
- 30 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico incluye (G) unir inmunoglobulina G del segundo eluato de intercambio catiónico a un segundo material de intercambio catiónico en condiciones de disolución que comprenden un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 1 a 15 mS/cm, (H) eluir la inmunoglobulina G unida del material de intercambio catiónico, en una tercera etapa de elución de intercambio catiónico, usando un tercer tampón de elución de intercambio catiónico que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 15,0 mS/cm a 300 mS/cm, e (I) recuperar un tercer eluato de intercambio catiónico, el tercer eluato de intercambio catiónico enriquecido en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas.
- 35 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el segundo material de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil.
- 40 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el segundo material de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico de carboximetilo.
- 45 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico incluye cromatografía de intercambio aniónico.
- 50 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico incluye (J) aplicar inmunoglobulina G a una columna de intercambio aniónico, en una etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico, en condiciones de disolución que comprenden un pH de 5,0 a 8,0 y una conductividad de 0,5 mS/cm a 5,0 mS/cm, y (K) recuperar una fracción no retenida de la etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico (J), estando la fracción no retenida enriquecida en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas.
- 55 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, las condiciones de disolución usadas en la etapa (J) incluyen un pH de 6,0 a 7,0.
- 60 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, las condiciones de disolución usadas en la etapa (J) incluyen un pH de 6,2 a 6,6.
- 65 En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, las condiciones de disolución usadas en la etapa

(J) incluyen una conductividad de 1 mS/cm a 4,5 mS/cm.

En algunas realizaciones de los métodos descritos anteriormente, los métodos también incluyen (L) reducir la carga viral de la composición mediante nanofiltración.

5 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un tercer método, el tercer método para preparar una preparación de inmunoglobulina enriquecida en inmunoglobulinas relacionadas con enfermedad cerebral, incluyendo el tercer método (A) proporcionar una composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG, incluyendo las inmunoglobulinas IgG una inmunoglobulina anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), una  
10 inmunoglobulina anti-RAGE, una inmunoglobulina anti- $\alpha$ -sinucleína, u otra inmunoglobulina específica para una proteína relacionada con enfermedad cerebral. El método incluye además (B) aplicar la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma a una columna de intercambio aniónico en condiciones de disolución que fomenten la unión de una mayoría de inmunoglobulinas IgG en la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma al material de intercambio aniónico en la columna de intercambio aniónico. El método incluye además (C)  
15 recoger una fracción no retenida de la aplicación en la etapa (B), estando la fracción no retenida enriquecida en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, otras inmunoglobulinas específicas de una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas.

20 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en (A) incluye una inmunoglobulina anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ).

En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en (A) incluye una inmunoglobulina anti-RAGE.

25 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en (A) incluye una inmunoglobulina anti- $\alpha$ -sinucleína.

30 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en (A) incluye una inmunoglobulina específica para una proteína relacionada con enfermedad cerebral seleccionada del grupo que consiste en proteína priónica principal (PrP), huntingtina (HD), prolactina (PRL), beta2-microglobulina ( $\beta$ 2 M), proteína tau asociada a microtúbulos (tau), ubiquitina (UBB; UBC) y cistatina C (CST3).

35 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en (A) tiene un título mayor de una inmunoglobulina anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), una inmunoglobulina anti-RAGE, una inmunoglobulina anti- $\alpha$ -sinucleína, u otra inmunoglobulina específica para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, en comparación con el título de una composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma preparada a partir de una agrupación de plasmas que contiene plasma de  
40 1.000 donantes al azar.

En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en (A) se prepara mediante un método que incluye una etapa de precipitación con alcohol.

45 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, la etapa de precipitación con alcohol incluye la formación de precipitado seleccionado del grupo que consiste en un precipitado de fracción I, un precipitado de fracción II de Cohn, un precipitado de fracción II+III de Cohn, un precipitado de fracción I+II+III de Cohn, un precipitado G, un precipitado A de Kistler-Nitschmann y un precipitado de gammaglobulina de Kistler-Nitschmann.

50 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en la etapa (A) es un precipitado G en suspensión.

En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en la etapa (A) es un sobrenadante de fracción I.

55 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en la etapa (A) es una fracción de plasma que se ha enriquecido en al menos una etapa cromatográfica previa.

60 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, la al menos una etapa cromatográfica previa es una etapa cromatográfica de intercambio catiónico.

En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, los métodos incluyen además el enriquecimiento de inmunoglobulina G en la fracción no retenida de intercambio aniónico.

65

- 5 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, el enriquecimiento de inmunoglobulina G en la fracción no retenida de intercambio aniónico incluye (D) reducir la conductividad del eluato recuperado en la etapa (C) hasta una conductividad final de no más de 15 mS/cm, formándose de ese modo una composición de IgG de conductividad reducida.
- 10 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, el enriquecimiento de inmunoglobulina G en la fracción no retenida de intercambio aniónico incluye (E) unir inmunoglobulina G de la fracción no retenida de intercambio aniónico a un material de intercambio catiónico en condiciones de disolución que incluyen un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 1 a 15 mS/cm, (F) eluir la inmunoglobulina G unida del material de intercambio catiónico, en una etapa de elución de intercambio catiónico, usando un tampón de elución de intercambio catiónico que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 15,0 mS/cm a 300 mS/cm, y (G) recuperar un eluato de intercambio catiónico, estando el eluato de intercambio catiónico enriquecido en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas.
- 20 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, el material de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil.
- En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, el material de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico de carboximetilo.
- 25 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el eluato de intercambio catiónico incluye cromatografía de intercambio aniónico.
- 30 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el eluato de intercambio catiónico incluye (H) aplicar inmunoglobulina G a una segunda columna de intercambio aniónico, en una segunda etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico, en condiciones de disolución que incluyen un pH de 5,0 a 8,0 y una conductividad de 0,5 mS/cm a 5,0 mS/cm, e (I) recuperar una fracción no retenida de la segunda etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico (H), estando la fracción no retenida enriquecida en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, otras inmunoglobulinas específicas de una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas.
- 35 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, las condiciones de disolución usadas en la etapa (H) incluyen un pH de 6,0 a 7,0.
- 40 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, las condiciones de disolución usadas en la etapa (H) incluyen un pH de 6,2 a 6,6.
- 45 En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, las condiciones de disolución usadas en la etapa (H) incluyen una conductividad de 1 mS/cm a 4,5 mS/cm.
- En algunas realizaciones del tercer método descrito anteriormente, el método también incluye (K) reducir la carga viral de la composición mediante nanofiltración.
- 50 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un cuarto método, el cuarto método para preparar una preparación de inmunoglobulina enriquecida en inmunoglobulinas relacionadas con enfermedad cerebral, incluyendo el método mezclar una primera composición de inmunoglobulina preparada según una cualquiera de las realizaciones anteriores con una segunda preparación de inmunoglobulina que no está enriquecida en inmunoglobulina relacionada con enfermedad cerebral.
- 55 En algunas realizaciones del cuarto método descrito anteriormente, la primera composición de inmunoglobulina se mezcla con la segunda preparación de inmunoglobulina en una razón de desde 4:1 hasta 1:100.
- 60 En algunas realizaciones del cuarto método descrito anteriormente, la primera composición de inmunoglobulina se mezcla con la segunda preparación de inmunoglobulina en una razón de 4:1 a 1:1.
- 65 En algunas realizaciones del cuarto método descrito anteriormente, la primera composición de inmunoglobulina se mezcla con la segunda preparación de inmunoglobulina en una razón de 1:1 a 1:100.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una composición de inmunoglobulina enriquecida en inmunoglobulinas relacionadas con enfermedad cerebral preparada según cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

5 En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la composición está enriquecida en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ). En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la composición está enriquecida en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A  $\beta$ ) de subclase IgG<sub>3</sub>.

10 En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la composición está enriquecida en inmunoglobulinas anti-RAGE. En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la composición está enriquecida en inmunoglobulinas anti-RAGE de subclase IgG<sub>1</sub> y/o IgG<sub>4</sub>.

15 En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la composición está enriquecida en inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína.

20 En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la composición está enriquecida en otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la otra inmunoglobulina específica para una proteína relacionada con enfermedad cerebral es una inmunoglobulina IgG que se une específicamente a una proteína seleccionada de la proteína priónica principal (PrP), huntingtina (HD), prolactina (PRL), beta2-microglobulina ( $\beta$ 2 M), proteína tau asociada a microtúbulos (tau), ubiquitina (UBB; UBC) y cistatina C (CST3).

25 En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la composición está enriquecida en inmunoglobulinas de la subclase IgG<sub>3</sub>.

30 En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la composición está enriquecida en inmunoglobulinas que tienen N-glicanos ANaF biantenarios monosialilados. En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la composición está enriquecida en inmunoglobulinas de la subclase IgG<sub>1</sub> que tienen N-glicanos biantenarios monosialilados.

35 En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la composición está enriquecida en inmunoglobulinas que tienen N-glicanos AFF biantenarios bigalactosilados. En algunas realizaciones de las composiciones de IgG descritas anteriormente, la composición está enriquecida en inmunoglobulinas de la subclase IgG<sub>1</sub> que tienen N-glicanos AFF biantenarios bigalactosilados.

40 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un quinto método, el quinto método para tratar una enfermedad o un trastorno cerebral que incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de inmunoglobulina relacionada con enfermedad cerebral enriquecida en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas para un sujeto que lo necesita.

45 En algunas realizaciones del quinto método descrito anteriormente, la composición de inmunoglobulina relacionada con enfermedad cerebral se prepara mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

50 En algunas realizaciones del quinto método descrito anteriormente, la enfermedad o el trastorno cerebral tratado se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, encefalopatía espongiiforme transmisible, enfermedad de Huntington, un prolactinoma, amiloidosis relacionada con diálisis, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad de Pick y angiopatía amiloide cerebral de tipo islandés.

55 En algunas realizaciones del quinto método descrito anteriormente, la enfermedad es enfermedad de Alzheimer.

En algunas realizaciones del quinto método descrito anteriormente, la enfermedad es enfermedad de Parkinson.

### 55 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra un método a modo de ejemplo para la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma.

60 Las figuras 2A-2B notifican los datos obtenidos de los ELISA de anticuerpos anti-fibrillas de A $\beta$ 40 realizados en condiciones isotónicas (figura 2A) o de fuerza iónica baja (figura 2B) con muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma.

65 Las figuras 3A-3B ilustran las concentraciones relativas de anticuerpos IgG anti-fibrillas de A $\beta$ 40 en muestras

coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma, tal como se determinó en condiciones isotónicas (figura 3A) o de fuerza iónica baja (figura 3B).

- 5 Las figuras 4A-4B notifican los datos obtenidos de ELISA de anticuerpos anti-CAPS de A $\beta$ 40 realizados en condiciones isotónicas (figura 4A) o de fuerza iónica baja (figura 4B) con muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma.
- 10 Las figuras 5A-5B ilustran las concentraciones relativas de anticuerpos IgG anti-CAPS de A $\beta$ 40 en muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma, tal como se determinó en condiciones isotónicas (figura 5A) o de fuerza iónica baja (figura 5B).
- 15 Las figuras 6A-6B notifican los datos obtenidos de los ELISA de anticuerpos anti-monómeros de A $\beta$ 42 realizados en condiciones isotónicas (figura 6A) o de fuerza iónica baja (figura 6B) con muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma.
- 20 Las figuras 7A-7B ilustran las concentraciones relativas de anticuerpos IgG anti-monómeros de A $\beta$ 42 en muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma, tal como se determinó en condiciones isotónicas (figura 7A) o de fuerza iónica baja (figura 7B).
- 25 Las figuras 8A-8B ilustran las concentraciones relativas promedio de anticuerpos IgG anti-fibrillas de A $\beta$ 40, anti-CAPS de A $\beta$ 40 y anti-monómeros de A $\beta$ 42 en muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma, tal como se determinó en condiciones isotónicas (figura 8A) o de fuerza iónica baja (figura 8B).
- 30 Las figuras 9A-9B proporcionan los resultados del análisis de subclases de IgG de muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma. La figura 9A notifica la distribución de subclases para cada una de las muestras coincidentes. La figura 9B ilustra la distribución de subclases promedio en todas las muestras coincidentes.
- 35 Las figuras 10A-10C proporcionan los resultados del análisis de IgA e IgM de muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma. La figura 10A notifica el contenido de IgA e IgM de cada una de las muestras coincidentes. La figura 10B ilustra la concentración relativa de IgA en cada una de las muestras coincidentes. La figura 10C ilustra la concentración relativa de IgM en cada una de las muestras coincidentes.
- 40 Las figuras 11A-11B proporcionan los resultados del análisis mediante HP-SEC de la distribución de tamaño de proteína en muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma. La figura 11A ilustra la distribución de tamaño promedio en todas las muestras coincidentes. La figura 11B notifica la distribución de tamaños de proteína en cada una de las muestras coincidentes.
- 45 Las figuras 12A-12B notifican los datos obtenidos (figura 12A) de ELISA de anticuerpos anti-lectina SNA realizados con muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma, e ilustra (figura 12B) la unión relativa de IgG a lectina SNA como porcentaje de unión de IgG de plasma de control para cada una de las muestras coincidentes.
- 50 La figura 13 notifica los resultados del análisis de N-glicano total en muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma.
- 55 La figura 14 notifica los resultados del análisis de N-glicano específico de Fc de IgG<sub>1</sub> en muestras coincidentes del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma.
- 60 Las figuras 15A-15C ilustran la concentración relativa de N-glicanos específicos de Fc de IgG<sub>1</sub> presentes en muestras coincidentes LE12H252Z (figura 15A), LE12H254Z (figura 15B) y LE12H255Z (figura 15C) del eluato de intercambio catiónico y la fracción de lavado 2 M correspondiente generados durante la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma.
- 65

La figura 16 ilustra un método a modo de ejemplo para la preparación de composiciones de IgG derivadas de plasma enriquecidas en anticuerpos IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral.

5 La figura 17A ilustra una representación gráfica de la agregación de proteína en función de la concentración de proteína para muestras de una fracción de lavado con alto contenido de sal de CM sometida a ultra/diafiltración en tampón a pH 5,0, 6,0 y 7,0.

10 La figura 17B ilustra la estabilidad de una fracción de lavado con alto contenido de sal de CM sometida a ultra/diafiltración en tampón a pH 7,0, 11,5 mS/cm, durante un periodo de incubación de siete meses.

15 Las figuras 18A-18I ilustran representaciones gráficas de contorno de recuperación de IgG, IgA e IgM a partir de fracciones de lavado de CM con alto contenido de sal después de ultra/diafiltración y filtración estéril a través de intervalos de pH de 5-7, conductividad de 1,0 mS/cm a 8,0 mS/cm y concentración de proteína del 0,2% (2 g/l) al 1,5% (15 g/l).

La figura 18J ilustra una superposición de representaciones gráficas de contorno de experimentos de recuperación de IgG, IGA e IgM realizados a pH 5,0.

20 La figura 19 ilustra las curvas de ruptura de IgG para resinas de intercambio catiónico CM Sepharose ff y CM Ceramic Hyper D.

25 La figura 20 muestra los resultados del análisis de isoelectroenfoque de lotes de IGIV comerciales (carriles 3-5), IgG preparada a partir de una fracción de lavado con alto contenido de sal de CM usando cromatografía en CM Sepharose ff (carril 6) e IgG preparada a partir de una fracción de lavado con alto contenido de sal de CM usando cromatografía en CM Ceramic Hyper D4 (carril 6). Los marcadores de intervalo amplio e intervalo alto se muestran en los carriles 1 y 2, respectivamente.

30 Las figuras 21A-21B muestran los resultados del análisis mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras (figura 21A) y reductoras (figura 21B) de lotes de IGIV comerciales (carriles 2-4), IgG preparada a partir de una fracción de lavado con alto contenido de sal de CM usando cromatografía en CM Sepharose ff (carril 5), e IgG preparada a partir de una fracción de lavado con alto contenido de sal de CM usando cromatografía en CM Ceramic Hyper D4 (carril 6). Las proteínas marcadoras se muestran en el carril 1.

### 35 Descripción detallada de la invención

#### I. Introducción

40 La preparación de composiciones de IgG derivadas de plasma enriquecidas en anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, tales como anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína, es altamente deseable debido a su potencial terapéutico para tratar enfermedades tales como enfermedad de Alzheimer y Parkinson. Desafortunadamente, los esfuerzos para preparar tales preparaciones de IgG derivadas de plasma enriquecidas han fracasado hasta la fecha. Por ejemplo, según el conocimiento de los inventores, no hay disponible ninguna preparación de IgG natural con título de anticuerpos anti-A $\beta$  altamente enriquecido. Además, no se conocen métodos que puedan usarse para enriquecer IgG anti-A $\beta$  derivadas de plasma a gran escala, sin afectar a los procesos comerciales usados para fabricar productos terapéuticos de IgG derivados de plasma, tales como IGIV e IgG para administración subcutánea.

50 En un aspecto, la presente descripción proporciona métodos para enriquecer tales anticuerpos a partir de fracciones cromatográficas preparadas, pero no usadas, durante la fabricación de productos de inmunoglobulina G, tales como inmunoglobulina G intravenosa (IGIV). Ventajosamente, se encontró que los anticuerpos IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína) se unen a materiales de intercambio catiónico con mayor afinidad que otros anticuerpos IgG presentes en el plasma.

55 Por ejemplo, la cromatografía de intercambio catiónico se usa para enriquecer las IgG recuperadas de un precipitado con etanol de fracción II+III (Teschner W. *et al.*, Vox Sanguinis 92, 42-55 (2006), que se refiere al uso de fraccionamiento con alcohol y enriquecimiento cromatográfico para la preparación de composiciones de IgG derivadas de plasma). En esta etapa, las IgG se unen a un material de intercambio catiónico débil (por ejemplo, una resina de intercambio catiónico de carboximetilo), la resina unida se lava y la mayor parte del contenido de IgG unida se eluye de la columna aumentando la fuerza iónica y el pH de las condiciones de disolución (por ejemplo, aplicando un tampón de elución a la resina unida). Después de la elución de la mayor parte de la IgG unida, la resina de intercambio catiónico se regenera separando cualquier molécula que permanezca unida en condiciones de fuerza iónica extrema (por ejemplo, con una disolución que contiene cloruro de sodio 2 M), lo que permite que la resina se reutilice en procesos de fabricación posteriores.

65 Sorprendentemente, se descubrió que la fracción con alto contenido de sal formada durante este proceso de

regeneración (por ejemplo, la “fracción de lavado 2 M”), que contiene pequeñas cantidades de IgG (por ejemplo, menos del 5% del contenido de IgG en los materiales de partida), está altamente enriquecida para los anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, tales como los anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína. Tal como se muestra en el ejemplo 2, la actividad de unión contra todos los conformeros de A $\beta$  sometidos a prueba se enriquece al menos de 2 a 4,5 veces en la fracción de lavado 2 M, en comparación con la fracción de eluato de intercambio catiónico correspondiente (figuras 8A-8B). La purificación adicional de estas fracciones de lavado a 2 M, tal como se describe en el ejemplo 9, da como resultado la producción de composiciones de IgG derivadas de plasma altamente puras (por ejemplo, más del 99% de IgG), que contiene una unión de 65 a 95 veces mayor a todos los conformeros de A $\beta$  sometidos a prueba, en comparación con la unión a conformero de A $\beta$  promedio en composiciones de IgG derivadas de plasma a gran escala preparadas según el método expuesto en la figura 1 (tabla 6). Un análisis adicional, notificado en el ejemplo 9, reveló que otros anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral también están altamente enriquecidos en estas composiciones. Por ejemplo, las actividades de unión a anticuerpos anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína son 20 veces y 50 veces mayores, respectivamente, en estas composiciones que en lotes promedio de composiciones de IgG derivadas de plasma a gran escala preparadas según el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

Tal como apreciará un experto en la técnica, las moléculas de inmunoglobulina que se unen fuertemente a un material de intercambio catiónico (por ejemplo, los anticuerpos IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral descritos en el presente documento) se unirán débilmente a un material de intercambio aniónico. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los anticuerpos IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, los anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína) pueden aislarse aplicando una composición de inmunoglobulinas IgG derivadas de plasma a un material de intercambio aniónico (por ejemplo, resina de intercambio aniónico) en condiciones de disolución que fomenten la unión de la mayoría de las inmunoglobulinas IgG al material de intercambio aniónico, y luego la recuperación de la fracción de inmunoglobulinas IgG que no se unen al material de intercambio aniónico (por ejemplo, una fracción no retenida de una columna de intercambio aniónico), que están enriquecidas en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral.

También se proporcionan en el presente documento métodos para producir composiciones de IgG derivadas de plasma con títulos específicos de inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, complementando una composición de IgG total derivada de plasma (por ejemplo, una composición de IgG derivadas de plasma fabricada comercialmente tal como IGIV e IgG para administración subcutánea) con una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral descritas en el presente documento. De esta manera, el título de una inmunoglobulina anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral específica (por ejemplo, una inmunoglobulina anti-A $\beta$ ) puede adaptarse para su uso como medicamento para una indicación particular (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer).

Por tanto, se describen en el presente documento métodos para la fabricación de composiciones de inmunoglobulinas G derivadas de plasma altamente enriquecidas para anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína). Estos métodos no afectan a los procesos de fabricación o las capacidades para productos terapéuticos de IgG derivadas de plasma producidos comercialmente.

También se proporcionan en el presente documento composiciones de IgG derivadas de plasma que están altamente enriquecidas para anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína), que puede obtenerse mediante los métodos proporcionados en el presente documento.

En otros aspectos, también se proporcionan métodos para el tratamiento de enfermedades y trastornos cerebrales. Estos métodos incluyen la administración de composiciones de IgG derivadas de plasma altamente enriquecidas para anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, anticuerpos anti-A $\beta$ , anti-RAGE y anti- $\alpha$ -sinucleína), que puede obtenerse mediante los métodos proporcionados en el presente documento.

## II Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, el término “composición enriquecida” se refiere a una composición de proteína aislada de una muestra de plasma, en la que la pureza de una proteína de interés (por ejemplo, un anticuerpo anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, tal como el anticuerpo anti-A $\beta$ , anti-RAGE y/o anti- $\alpha$ -sinucleína) es mayor que la pureza de la proteína de interés en la muestra de partida (por ejemplo, plasma agrupado). En algunas realizaciones, la pureza de la proteína de interés en la composición enriquecida es al menos el 25% mayor que la pureza de la proteína de interés en la muestra de partida. En algunas realizaciones, la pureza de la proteína de interés en la composición enriquecida es al menos el 50%, el 75%, el 100%, el 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más, mayor que la pureza de la proteína de interés en la muestra de partida. Por ejemplo, una composición enriquecida en anticuerpo anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, tal como un anticuerpo anti-A $\beta$ , anti-RAGE y/o anti- $\alpha$ -sinucleína, en la que el 7% de la proteína total es un anticuerpo anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, tal como un anticuerpo anti-A $\beta$ , anti-RAGE

y/o anti- $\alpha$ -sinucleína, se enriquece 7 veces en comparación con una muestra de partida en la que el 1% de la proteína total es un anticuerpo anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, tal como un anticuerpo anti-A $\beta$ , anti-RAGE y/o anti- $\alpha$ -sinucleína.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “proteína relacionada con enfermedad cerebral” se refiere a la proteína asociada con una enfermedad o un trastorno del cerebro. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una proteína relacionada con enfermedad cerebral es una proteína vinculada a una enfermedad o un trastorno del cerebro que se expresa erróneamente (por ejemplo, se sobreexpresa o subexpresa) en el cerebro, se muta en una enfermedad o un trastorno del cerebro, se localiza de manera anómala (por ejemplo, se ubica erróneamente o se ubica en exceso como en la deposición de placas de proteína en la corteza cerebral). Los ejemplos no limitativos de proteínas relacionadas con enfermedad cerebral incluyen beta-amiloide (A $\beta$ ), alfa-sinucleína (SNCA), proteína priónica principal (PrP), huntingtina (HD), prolactina (PRL), cistatina C (CST3), proteína tau asociada a microtúbulos (tau), ubiquitina (UBB; UBC) y receptor específico de productos finales de glicosilación avanzada (RAGE). La tabla 1 proporciona ejemplos no limitativos de proteínas relacionadas con enfermedad cerebral y su enfermedad cerebral correspondiente.

Tabla 1. Las proteínas relacionadas con enfermedad cerebral a modo de ejemplo y su enfermedad cerebral correspondiente.

Enfermedad	Proteína relacionada	Registro GenBank	Registro UniProt
Enfermedad de Alzheimer	Beta-amiloide (A $\beta$ ; Abeta)	NP_000475	P05067
Enfermedad de Parkinson	Alfa-sinucleína (SNCA)	NP_000336	P37840
Encefalopatía espongiiforme transmisible (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob)	Proteína priónica principal (PrP)	NP_000302	P04156
Enfermedad de Huntington	Huntingtina (HD)	NP_002102	P42858
Prolactinomas	Prolactina (PRL)	NP_000939	P01236
Amiloidosis relacionada con diálisis	Beta2-microglobulina ( $\beta$ 2 M)	NP_004039	P61769
Angiopatía amiloide cerebral	Beta-amiloide (A $\beta$ ; Abeta)	NP_000475	P05067
Angiopatía amiloide cerebral (tipo islandés)	Cistatina C (CST3)	NP_000090	P01034
Enfermedad de Alzheimer	Receptor específico de productos finales de glicosilación avanzada (RAGE)	NP_001127	Q15109
Enfermedad de Pick	Proteína asociada a microtúbulos tau (tau)	NP_001116538	P10636
Enfermedad de Pick	Ubiquitina (UBB; UBC)	NP_061828; NP_066289	P0CG47; P0CG48

20 Los trastornos neurodegenerativos del SNC se caracterizan normalmente por una disfunción progresiva y/o muerte celular en el sistema nervioso central. El rasgo distintivo de muchos trastornos neurodegenerativos del SNC es la acumulación de proteínas con plegamiento erróneo, tales como beta-amiloide, tau, alfa-sinucleína y TDP-43, tanto de manera intracelular como extracelular. Muchas enfermedades neurodegenerativas también están asociadas con una disfunción mitocondrial pronunciada. Los ejemplos comunes de trastornos neurodegenerativos del SNC incluyen la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Pick (EPI).

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “trastorno cerebral neurodegenerativo” se refiere a una enfermedad o un trastorno caracterizado por disfunción progresiva y/o muerte celular en el cerebro. El rasgo distintivo de muchos trastornos cerebrales neurodegenerativos es la acumulación de proteínas con plegamiento erróneo, tales como beta-amiloide, tau, alfa-sinucleína y TDP-43, tanto de manera intracelular como extracelular. Muchas enfermedades neurodegenerativas también están asociadas con una disfunción mitocondrial pronunciada en el cerebro. Los ejemplos no limitativos de trastornos cerebrales neurodegenerativos incluyen enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, atrofia olivopontocerebelosa (AOPC), síndrome de Shy-Drager, degeneración estriatonigra, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), temblor hereditario, degeneración ganglionar corticobasal, enfermedad difusa por cuerpos de Lewy, complejo de Parkinson-ELA-demencia de Guam y enfermedad de Pick. Los ejemplos no limitativos de tipos de células que se encuentran en el cerebro incluyen células neuronales (por ejemplo, piramidales, de Purkinje, locus cerúleo, neuronas espinosas medianas, neuronas fusiformes y células granulares),

células interneuronales (por ejemplo, células en cesta, células estrelladas, células en cepillo unipolares) y células de la glía (por ejemplo, astrocitos, oligodendrocitos, epéndimo y células de la glía radiales).

5 Tal como se usan en el presente documento, los términos "inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título" e "IgG agrupada de anti- $\beta$ -amiloide de alto título" se refieren a una composición que contiene inmunoglobulina G (IgG) polivalente purificada de la sangre/plasma de múltiples donantes, por ejemplo, más de cincuenta, o más de cien, o más de mil donantes de sangre/plasma, que tiene un título relativo de inmunoglobulina G anti- $\beta$ -amiloide que es mayor que el título esperado de inmunoglobulinas anti- $\beta$ -amiloide en una composición de IgG agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. Las preparaciones de inmunoglobulina G intravenosa (IGIV) disponibles comercialmente contienen IgG que reconocen específicamente epítomos de diversos confórmers de  $\beta$ -amiloide, por ejemplo, monómeros de  $\beta$ -amiloide, fibrillas de  $\beta$ -amiloide y especies de proteínas  $\beta$ -amiloide reticuladas (CAPS, por sus siglas en inglés). Se ha notificado que una preparación comercial de GAMMAGARD® LIQUID (infusión al 10% de inmunoglobulina (humana)) contiene el 0,1% de IgG anti-fibrilla de  $\beta$ -amiloide, el 0,04% de IgG anti-CAPS y el 0,02% de IgG de anti-monómeros de  $\beta$ -amiloide, que tiene afinidades de CE<sub>50</sub> de 40 nM, 40 nM y 350 nM por su confórmero de  $\beta$ -amiloide diana, respectivamente (O'Nuallain B. *et al.*, Biochemistry, 25 de noviembre de 2008; 47(47):12254-6). En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene un alto título de IgG específica para uno o más confórmers de  $\beta$ -amiloide. En otras realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene un alto título de IgG específica para monómeros de  $\beta$ -amiloide, fibrillas de  $\beta$ -amiloide y especies de proteínas  $\beta$ -amiloide reticuladas (CAPS).

Por consiguiente, en una realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,1% de IgG anti- $\beta$ -amiloide (por ejemplo, el 0,1% de IgG con afinidad específica para cualquier confórmero de  $\beta$ -amiloide). En otra realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,2% de IgG anti- $\beta$ -amiloide. En aún otras realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,15%, el 0,2%, el 0,25%, el 0,3%, el 0,35%, el 0,4%, el 0,45%, el 0,5%, el 0,55%, el 0,6%, el 0,65%, el 0,7%, el 0,75%, el 0,8%, el 0,85%, el 0,9%, el 0,95%, el 1,0%, el 1,5%, el 2,0%, el 2,5%, el 3,0%, el 3,5%, el 4,0%, el 4,5%, el 5,0% o más de IgG anti- $\beta$ -amiloide.

30 En una realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,1% de IgG anti-fibrilla de  $\beta$ -amiloide. En otra realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,2% de IgG anti-fibrilla de  $\beta$ -amiloide. En aún otras realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,15%, el 0,2%, el 0,25%, el 0,3%, el 0,35%, el 0,4%, el 0,45%, el 0,5%, el 0,55%, el 0,6%, el 0,65%, el 0,7%, el 0,75%, el 0,8%, el 0,85%, el 0,9%, el 0,95%, el 1,0%, el 1,5%, el 2,0%, el 2,5%, el 3,0%, el 3,5%, el 4,0%, el 4,5%, el 5,0% o más de IgG anti-fibrilla de  $\beta$ -amiloide.

40 En una realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,04% de IgG anti-CAPS. En otra realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,08% de IgG anti-CAPS. En aún otras realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,04%, el 0,05%, el 0,06%, el 0,07%, el 0,08%, el 0,09%, el 0,1%, el 0,15%, el 0,2%, el 0,25%, el 0,3%, el 0,35%, el 0,4%, el 0,45%, el 0,5%, el 0,55%, el 0,6%, el 0,65%, el 0,7%, el 0,75%, el 0,8%, el 0,85%, el 0,9%, el 0,95%, el 1,0%, el 1,5%, el 2,0%, el 2,5%, el 3,0%, el 3,5%, el 4,0%, el 4,5%, el 5,0% o más de IgG anti-CAPS.

45 En una realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,02% de IgG anti-monómeros de  $\beta$ -amiloide. En otra realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,04% de IgG anti-monómeros de  $\beta$ -amiloide. En aún otras realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos el 0,02%, el 0,03%, el 0,04%, el 0,05%, el 0,06%, el 0,07%, el 0,08%, el 0,09%, el 0,1%, el 0,15%, el 0,2%, el 0,25%, el 0,3%, el 0,35%, el 0,4%, el 0,45%, el 0,5%, el 0,55%, el 0,6%, el 0,65%, el 0,7%, el 0,75%, el 0,8%, el 0,85%, el 0,9%, el 0,95%, el 1,0%, el 1,5%, el 2,0%, el 2,5%, el 3,0%, el 3,5%, el 4,0%, el 4,5%, el 5,0% o más de IgG anti-monómeros de  $\beta$ -amiloide.

55 En una realización, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un confórmero de  $\beta$ -amiloide (por ejemplo, un monómero de A $\beta$ 42, una CAPS de A $\beta$ 40 o una fibrilla de A $\beta$ 40) que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene una actividad de unión al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más, veces mayor para al menos un confórmero de  $\beta$ -amiloide que una composición de IgG total preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de

inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título se enriquece para un anticuerpo anti- $\beta$ -amiloide en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti- $\beta$ -amiloide en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

5 Se conocen en la técnica métodos que pueden usarse para medir la actividad de unión de los anticuerpos anti-A $\beta$  (por ejemplo, en una muestra de plasma o en una composición de IgG derivadas de plasma), por ejemplo, tal como se describe en O'Nuallain B. *et al.*, *Biochemistry*, 25 de noviembre de 2008; 47(47):12254-6, publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2012/0183527, y solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 13/714.309, que se refieren a la detección de anticuerpos en muestras biológicas incluyendo, sin limitación, sangre, plasma, y  
10 composiciones purificadas a partir de plasma.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “unión específica”, “anticuerpo que reconoce” un antígeno, “anticuerpo específico” para un antígeno y “anticuerpo que se une específicamente” a un antígeno se usan indistintamente y se refieren a una cualidad de unión selectiva de un anticuerpo para un epítipo diana específico (es decir, una proteína relacionada con enfermedad cerebral particular) de tal manera que la  $K_D$  relativa del anticuerpo para el epítipo diana específico es al menos 5 veces menor, preferiblemente 10 veces menor, que la  $K_D$  del anticuerpo para otro ligando no seleccionado como diana.  
15

Tal como se usa en el presente documento, el término “plasma desprovisto de crioprecipitado (*cryo-poor plasma*)” se refiere a un sobrenadante formado mediante crioprecipitación de plasma sanguíneo (por ejemplo, plasma de una única fuente o una agrupación de plasma de múltiples fuentes). La crioprecipitación se realiza normalmente descongelando plasma congelado a una temperatura cercana a la de congelación, por ejemplo, a una temperatura inferior a aproximadamente 10°C, preferiblemente a una temperatura no mayor de aproximadamente 6°C. Tal como se usa en el presente documento “plasma”, a menos que se especifique lo contrario, se refiere tanto a plasma recuperado (es decir, plasma que se ha separado de la sangre completa *ex vivo*) como a plasma fuente (es decir, plasma recogido mediante plasmaféresis). Aunque la crioprecipitación se realiza comúnmente descongelando plasma congelado previamente (por ejemplo, plasma agrupado) que ya se ha analizado por motivos de seguridad y calidad, en algunas realizaciones, también puede usarse plasma fresco. Después de la descongelación completa del plasma congelado a baja temperatura, los crioprecipitados sólidos se separan del sobrenadante líquido (es decir, el “plasma desprovisto de crioprecipitado”) en frío (por ejemplo, a una temperatura inferior a aproximadamente 10°C, preferiblemente de no más de 6°C) mediante centrifugación, filtración u otros medios adecuados.  
20  
25  
30

Tal como se usa en el presente documento, una “agrupación de Cohn” o “agrupación de plasmas de Cohn” se refiere al material de partida usado para el fraccionamiento de una muestra de plasma o agrupación de muestras de plasma. Las agrupaciones de Cohn incluyen, sin limitación, plasma completo, plasma desprovisto de crioprecipitado y agrupaciones de plasma completo, plasma desprovisto de crioprecipitado, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, una agrupación de Cohn se somete a una etapa de procesamiento previo. En determinadas realizaciones, una agrupación de Cohn es una muestra de plasma desprovisto de crioprecipitado de la que se han retirado uno o más factores sanguíneos en una etapa de procesamiento previo, por ejemplo, adsorción sobre una fase sólida, por ejemplo, hidróxido de aluminio o dióxido de silicio finamente dividido) o etapa cromatográfica (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o de afinidad de heparina). Pueden aislarse diversos factores sanguíneos, incluyendo pero sin limitarse a, actividad de corrección del inhibidor del factor ocho (FEIBA, por sus siglas en inglés), complejo de factor IX, concentrado de factor VII o el complejo de antitrombina III, de la muestra de plasma desprovisto de crioprecipitado antes de su uso como agrupación de Cohn para el aislamiento de IgG (por ejemplo, una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral).  
35  
40  
45

Tal como se usa en el presente documento, un “precipitado de fracción II+III” se refiere a un precipitado formado mediante incubación en frío de plasma sanguíneo o un derivado del mismo (por ejemplo, plasma desprovisto de crioprecipitado o sobrenadante de fracción I) después de la adición de alcohol (por ejemplo, etanol desnaturalizado) hasta una concentración final de aproximadamente el 17% a aproximadamente el 27% (v/v) a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0, y abarca productos intermedios comunes formados durante fraccionamientos con alcohol de Cohn-Oncley (por ejemplo, fracción II+III; Cohn *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 68:459-75 (1946); Oncley *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 71:541-50 (1949)) y Kistler-Nitschmann (por ejemplo, precipitado A; Kistler y Nitschmann, *Vox Sang.* 7:414-424 (1962)), y esquemas de fraccionamiento derivados de los mismos.  
50  
55

En algunas realizaciones, un “precipitado de fracción II+III de Cohn” se refiere a un precipitado formado mediante incubación en frío de plasma sanguíneo o un derivado del mismo (por ejemplo, plasma desprovisto de crioprecipitado del sobrenadante de fracción I) después de la adición de alcohol (por ejemplo, etanol desnaturalizado) hasta una concentración final de aproximadamente el 17% a aproximadamente el 27% (v/v), preferiblemente de aproximadamente 20% a 25% (v/v) a un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,0, y abarca productos intermedios comunes formado durante el fraccionamiento con alcohol de Cohn-Oncley (por ejemplo, fracción II+III; Cohn *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 68:459-75 (1946); Oncley *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 71:541-50 (1949)), y esquemas de fraccionamiento derivados del mismo.  
60  
65

En algunas realizaciones, un “precipitado II+III de Kistler-Nitschmann” se refiere a un precipitado formado mediante

incubación en frío de plasma sanguíneo o un derivado del mismo (por ejemplo, plasma desprovisto de crioprecipitado o sobrenadante B) después de la adición de alcohol (por ejemplo, etanol desnaturalizado) hasta una concentración final de aproximadamente el 17% a aproximadamente el 22% (v/v) a un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0, y abarca productos intermedios comunes formados durante el fraccionamiento de plasma de Kistler-Nitschmann (por ejemplo, precipitado A; Kistler y Nitschmann, Vox Sang. 7:414-424 (1962)), y esquemas de fraccionamiento derivados del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “alcohol” se refiere a un alcohol monohidroxilado C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> capaz de precipitar proteínas del plasma. En algunas realizaciones, el alcohol es etanol o metanol. En una realización preferida, el alcohol es un etanol desnaturalizado (por ejemplo, etanol SDA 3A que contiene aproximadamente el 95% de etanol y el 5% de metanol (p/p)). En algunas realizaciones, las concentraciones de alcohol usadas para las reacciones de precipitación divulgadas en el presente documento se refieren a una concentración final de un etanol desnaturalizado. El experto en la técnica entenderá cómo adaptar estos porcentajes para optimizar una reacción de precipitación cuando se usa un alcohol diferente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “ultrafiltración (UF)” abarca una variedad de métodos de filtración por membrana en los que la presión hidrostática fuerza un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos en suspensión y los solutos de alto peso molecular se retienen, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana. Este proceso de separación se usa a menudo para purificar y concentrar disoluciones macromoleculares (10<sup>3</sup> - 10<sup>6</sup> Da), especialmente disoluciones de proteínas. Hay varias membranas de ultrafiltración disponibles según el tamaño de las moléculas que retienen. La ultrafiltración se caracteriza normalmente por un tamaño de poro de membrana de entre 1 y 1000 kDa y presiones de funcionamiento de entre 0,01 y 10 bar.

Tal como se usa en el presente documento, el término “diafiltración” se realiza con la misma membrana o una membrana similar a la de ultrafiltración y se realiza normalmente en un modo de filtración de flujo tangencial. Durante la diafiltración, se introduce tampón en el tanque de reciclado mientras se retira el filtrado de la operación unitaria. En los procesos en los que el producto está en el producto retenido (por ejemplo, IgG), la diafiltración es particularmente útil para separar proteínas de moléculas pequeñas como azúcares y sales. En determinados casos, la diafiltración puede usarse para intercambiar la disolución, el tampón o componentes individuales de un sistema de tamponamiento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aproximadamente” denota un intervalo aproximado de más o menos el 10% de un valor especificado. Por ejemplo, la expresión “aproximadamente el 20%” abarca un intervalo del 18-22%.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad o dosis terapéuticamente eficaz” o “cantidad o dosis suficiente/eficaz” se refiere a una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y la determinará un experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vol. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999)); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>a</sup> edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Tal como se usan en el presente documento, los términos “administración intranasal” y “administración nasal” se refieren a la administración de una composición terapéutica a la cavidad nasal de un sujeto de tal manera que un agente terapéutico en la composición se administra directamente a uno o más epitelios ubicados en la nariz. En determinadas realizaciones, la administración intranasal se logra usando una preparación líquida (por ejemplo, una preparación acuosa), una preparación en aerosol o una preparación en polvo seco, cada una de las cuales puede administrarse a través de un dispositivo de administración nasal no invasivo de propulsión externa o autopropulsado (por ejemplo, por inhalación), o mediante un gel, una crema pomada, loción o pasta aplicado directamente a uno o más epitelios nasales (por ejemplo, epitelio olfativo o epitelio respiratorio nasal).

Tal como se usan en el presente documento, los términos “dosis” y “dosificación” se usan indistintamente y se refieren a la cantidad de principio activo administrada a un individuo en cada administración. La dosis variará según varios factores, incluyendo la frecuencia de administración; la talla y tolerancia del individuo; la gravedad del estado; el riesgo de efectos secundarios; y la vía de administración. Un experto en la técnica reconocerá que la dosis puede modificarse dependiendo de los factores anteriores o en función del progreso terapéutico. El término “forma de dosificación” se refiere al formato particular del producto farmacéutico y depende de la vía de administración.

Tal como resultará evidente para los expertos en la técnica al leer esta divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene componentes y características discretos que pueden separarse fácilmente o combinarse con las características de cualquiera de las otras realizaciones varias sin apartarse del alcance de la presente invención. Cualquier método citado puede llevarse a cabo en el orden de los eventos citados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

### III. Enriquecimiento de anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral a partir de plasma

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para preparar una preparación de inmunoglobulinas enriquecida en inmunoglobulinas relacionadas con enfermedad cerebral a partir de plasma (por ejemplo, plasma humano agrupado). El método incluye proporcionar una composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma (por ejemplo, un precipitado en suspensión formado durante el fraccionamiento del plasma) que contiene inmunoglobulinas IgG incluyendo anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral). El método también incluye unir las inmunoglobulinas IgG a un material de intercambio catiónico (por ejemplo, en condiciones de conductividad y pH en las que se une la mayoría de las inmunoglobulinas IgG). El método, opcionalmente, también incluye una etapa de lavar el material de intercambio catiónico unido para retirar contaminantes unidos débilmente. Luego, el método incluye eluir la mayoría de las inmunoglobulinas IgG unidas del material de intercambio catiónico (por ejemplo, en condiciones en las que una población más pequeña de inmunoglobulinas IgG, enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, permanece unida al material de intercambio catiónico). El método luego incluye eluir inmunoglobulinas IgG no eluidas en la primera etapa de elución fuera de la columna de intercambio catiónico (por ejemplo, aumentando adicionalmente la conductividad o el pH de las condiciones de disolución, por ejemplo, en un tampón de elución), las inmunoglobulinas IgG no eluidas en la primera etapa de elución enriquecidas en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral).

En algunas realizaciones, estos métodos se logran eluyendo la mayor parte de las inmunoglobulinas IgG del material de intercambio catiónico (por ejemplo, una resina de intercambio catiónico débil, tal como una resina de carboximetilo (CM), en una primera etapa de elución, en condiciones de disolución (por ejemplo, con un tampón de elución) que tienen un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 10,0 y una conductividad de aproximadamente 3,0 mS/cm a aproximadamente 16,0 mS/cm.

En algunas realizaciones, la IgG que permanece unida al material de intercambio catiónico (por ejemplo, la resina de intercambio catiónico débil, tal como una resina de carboximetilo) después de la primera etapa de elución se eluye del material de intercambio catiónico, en una segunda etapa de elución, aumentando la conductividad y/o el pH de las condiciones de disolución usadas en la primera etapa de elución (por ejemplo, con un segundo tampón de elución que desestabiliza adicionalmente las interacciones entre las inmunoglobulinas IgG y el material de intercambio catiónico). Por ejemplo, cuando la primera elución se realizó usando un tampón de elución que tiene una conductividad de aproximadamente 5,0 mS/cm, pH 8,5, la segunda elución se realiza con un segundo tampón de elución que tiene una conductividad superior a 5,0 mS/cm y/o un pH superior a 8,5.

En algunas realizaciones, el segundo eluato, enriquecido en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) recuperadas del material de intercambio catiónico se enriquece o purifica adicionalmente para producir una composición final. En algunas realizaciones, la composición final está enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral), en comparación con la concentración relativa de las inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, por ejemplo, en el material de partida (por ejemplo, una muestra de plasma o agrupación de plasma) o en la primera fracción de eluato de la etapa de elución de intercambio catiónico, o alternativamente, con la concentración relativa de, por ejemplo, una preparación de IgG derivadas de plasma comercial promedio o una muestra de plasma humano promedio (por ejemplo, la concentración de IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral en la composición final es mayor que la concentración promedio en la población humana, la concentración promedio en muestras de plasma de al menos 1.000 individuos al azar, o la concentración promedio en muestras de al menos 1.000 lotes de una preparación de IgG derivadas de plasma comercial).

En algunas realizaciones, la composición enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) se enriquecen adicionalmente mediante una o más etapas de enriquecimiento posteriores, incluyendo pero sin limitarse a, otra etapa de precipitación (por ejemplo, fraccionamiento con alcohol o fraccionamiento con polietilenglicol), una etapa cromatográfica (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico tal como cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico, cromatografía de afinidad tal como cromatografía de afinidad de heparina, cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de exclusión molecular, o una combinación de las mismas), una etapa de filtración (por ejemplo, ultrafiltración y/o diafiltración, nanofiltración, filtración en profundidad o filtración esterilizante), ultracentrifugación, preparación electroforética, y similares.

En algunas realizaciones, el método incluye además someter la composición enriquecida en inmunoglobulinas IgG

anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) a una o más etapas dedicadas de eliminación y/o inactivación viral (por ejemplo, tratamiento con disolventes y detergentes (S/D), nanofiltración, tratamiento térmico o incubación a bajo pH). En algunas realizaciones, la composición de IgG se procesa adicionalmente (por ejemplo, se enriquece, se somete a intercambio de tampón o se filtra) antes y/o entre la realización de una o más etapas dedicadas de eliminación y/o inactivación viral.

En algunas realizaciones, el método incluye una etapa de purificación adicional de la composición enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) recuperadas de la segunda etapa de elución de intercambio catiónico mediante cromatografía de intercambio catiónico.

En algunas realizaciones, el método incluye una etapa de purificación adicional de la composición enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) recuperadas de la segunda etapa de elución de intercambio catiónico mediante cromatografía de intercambio aniónico de fracción no retenida.

En una realización específica, el método incluye etapas de purificación adicional de la composición enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) mediante cromatografía de intercambio catiónico y mediante cromatografía de intercambio aniónico de fracción no retenida.

En otra realización específica, las etapas del método de purificación adicional de la composición enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) mediante cromatografía de intercambio catiónico, mediante cromatografía de intercambio aniónico de fracción no retenida, mediante nanofiltración, y mediante incubación a bajo pH (por ejemplo, durante al menos una semana).

A continuación se proporcionan más detalles sobre las etapas de separación, enriquecimiento, purificación y eliminación y/o activación viral descritos anteriormente. Se contempla que todas las combinaciones de condiciones específicas (por ejemplo, pH, temperatura, concentración de precipitantes y/o fuerza iónica) para realizar cada uno de estas etapas individuales pueden usarse para realizar los métodos descritos en el presente documento para preparar una composición de inmunoglobulinas (por ejemplo, una composición de IgG derivadas del plasma) enriquecida en inmunoglobulina anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas IgG anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas IgG anti-RAGE, inmunoglobulinas IgG anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas IgG específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) a partir de plasma (por ejemplo, plasma agrupado humano). Por brevedad, cada una de estas condiciones específicas no se repiten en el presente documento.

#### 45 A. Preparación de plasma desprovisto de crioprecipitado (*cryo-poor plasma*)

El material de partida usado para la preparación de productos sanguíneos comerciales derivados del plasma, tales como IgG agrupada (por ejemplo, IGIV o IgG para administración subcutánea) consiste generalmente en lotes agrupados de plasma recuperado (es decir, plasma que se ha separado de la sangre completa *ex vivo*) y/o plasma fuente (es decir, plasma recogido mediante plasmaféresis). El proceso de purificación comienza generalmente descongelando el plasma agrupado congelado previamente, que ya se ha analizado por motivos de seguridad y calidad, a una temperatura no mayor de 6°C. Después de la descongelación completa del plasma congelado a baja temperatura, se realiza centrifugación en frío (por ejemplo,  $\leq 6^\circ\text{C}$ ) para separar los crioprecipitados sólidos del sobrenadante líquido. Alternativamente, esta etapa de separación puede realizarse mediante filtración, en lugar de centrifugación. El sobrenadante líquido (también denominado "plasma desprovisto de crioprecipitado") entonces, opcionalmente, se procesa previamente mediante la retirada de diversos factores, por ejemplo, actividad de corrección del inhibidor del factor ocho (FEIBA), complejo de factor IX, factor VII, antitrombina III, complejos de protrombina, mediante adsorción en fase sólida cromatografía, etc. El producto final de estas etapas, que se usa como material de partida para el proceso de fraccionamiento que da como resultado el aislamiento de IgG, alfa-1-antitripsina (A1PI) y/o albúmina, se denomina comúnmente la "agrupación de Cohn".

#### B. Precipitación de fracción I

Para formar un precipitado de fracción I (por ejemplo, una fracción I de Cohn o Kistler-Nitschmann), la agrupación de Cohn (por ejemplo, disolución de plasma desprovisto de crioprecipitado) se enfría hasta menos de aproximadamente

6°C (normalmente hasta aproximadamente  $0 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y el pH de la disolución se ajusta entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, el pH de la agrupación de Cohn se ajusta entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,3. En una realización específica, el pH del plasma desprovisto de crioprecipitado se ajusta a un pH de aproximadamente 7,2. Entonces se añade alcohol enfriado previamente (normalmente etanol, por ejemplo, etanol desnaturalizado) hasta una concentración objetivo de aproximadamente el 6% a aproximadamente el 10% (v/v), normalmente mientras se agita la disolución. En algunas realizaciones, se añade etanol (por ejemplo, etanol desnaturalizado) hasta una concentración objetivo de aproximadamente el 7% a aproximadamente el 9% (v/v). En una realización específica, se añade etanol (por ejemplo, etanol desnaturalizado) hasta una concentración objetivo de aproximadamente el 8% (v/v). Al mismo tiempo, se reduce adicionalmente la temperatura por debajo de  $0^\circ\text{C}$ , normalmente entre aproximadamente  $-4^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $0^\circ\text{C}$ . En una realización específica, la temperatura se reduce hasta aproximadamente  $-2^\circ\text{C}$ . Normalmente, la reacción de precipitación incluye un tiempo de mantenimiento de al menos aproximadamente 1 hora, aunque también pueden emplearse tiempos de mantenimiento más cortos o más largos. Después de completarse la reacción de precipitación, el sobrenadante (por ejemplo, "sobrenadante I") se separa entonces del precipitado (por ejemplo, precipitado de "fracción I") mediante centrifugación, filtración u otros medios adecuados.

### C. Precipitación de fracción II+III

Para formar un precipitado de fracción II+III (por ejemplo, un precipitado de fracción II+III de Cohn o un precipitado A de Kistler-Nitschmann), una agrupación de Cohn o un derivado del mismo (por ejemplo, un sobrenadante de fracción I) se enfría hasta por debajo de aproximadamente  $0^\circ\text{C}$  y el pH de la disolución se ajusta entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la agrupación de Cohn o el derivado del mismo se ajusta entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,0. En algunas realizaciones, el pH de la agrupación de Cohn o el derivado del mismo se ajusta entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,0. Entonces se añade alcohol enfriado previamente (normalmente etanol, por ejemplo, etanol desnaturalizado) hasta una concentración objetivo de aproximadamente el 17% a aproximadamente el 27% (v/v), normalmente mientras se agita la disolución. En algunas realizaciones, se añade etanol (por ejemplo, etanol desnaturalizado) hasta una concentración objetivo de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 25% (v/v). Al mismo tiempo, se reduce adicionalmente la temperatura, normalmente entre aproximadamente  $-9^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $-5^\circ\text{C}$ . En una realización específica, la temperatura se reduce hasta aproximadamente  $7^\circ\text{C}$  para precipitar los componentes del plasma desprovisto de crioprecipitado o derivados del mismo, incluida la IgG. Normalmente, la reacción de precipitación incluye un tiempo de incubación de al menos aproximadamente 1 hora, aunque también pueden emplearse tiempos de incubación más cortos o más largos. Después de completarse la reacción de precipitación, el sobrenadante (por ejemplo, el "sobrenadante II+III") se separa entonces del precipitado (por ejemplo, precipitado de "fracción II+III") mediante centrifugación, filtración u otros medios adecuados.

### D. Extracción de IgG y tratamiento con dióxido de silicio del precipitado de fracción II+III

Para solubilizar el contenido de IgG de un precipitado de fracción II+III, se usa un tampón de extracción frío para suspender el precipitado de fraccionamiento II+III en una razón típica de 1 parte de precipitado por 15 partes de tampón de extracción. Pueden usarse otras razones de resuspensión adecuadas, por ejemplo de desde aproximadamente 1:8 hasta aproximadamente 1:30, o de desde aproximadamente 1:10 hasta aproximadamente 1:20, o de desde aproximadamente 1:12 hasta aproximadamente 1:18, o de desde aproximadamente 1:13 hasta aproximadamente 1:17, o de desde aproximadamente 1:14 hasta aproximadamente 1:16. En determinadas realizaciones, la razón de resuspensión puede ser de aproximadamente 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, o mayor.

Las disoluciones adecuadas para la extracción del precipitado de fracción II+III tendrán generalmente un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,5. En determinadas realizaciones, la disolución tendrá un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,0, en otras realizaciones, la disolución de extracción tendrá un pH de aproximadamente 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 ó 5,5. En una realización preferida, el pH del tampón de extracción será de aproximadamente 4,5. En otra realización preferida, el pH del tampón de extracción será de aproximadamente 4,7. En otra realización preferida, el pH del tampón de extracción será de aproximadamente 4,9. En general, estos requisitos de pH pueden cumplirse usando un agente tamponante seleccionado de, por ejemplo, acetato, citrato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, mezclas de los mismos y similares. Las concentraciones de tampón adecuadas oscilan normalmente desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 100 mM, o desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 mM, o agente tamponante aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 mM.

El tampón de extracción tendrá preferiblemente una conductividad de desde aproximadamente  $0,5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  hasta aproximadamente  $2,0 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la conductividad del tampón de extracción será de aproximadamente  $0,5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ , o aproximadamente 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, o aproximadamente  $2,0 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Un experto en la técnica sabrá cómo generar tampones de extracción que tengan una conductividad adecuada.

En algunas realizaciones, la extracción se realiza entre aproximadamente  $0^\circ\text{C}$  y aproximadamente  $10^\circ\text{C}$ , o entre

aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C. En determinadas realizaciones, la extracción puede realizarse a aproximadamente 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C o 10°C. En una realización particular, la extracción se realiza a entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 10°C. Normalmente, el proceso de extracción avanzará durante entre aproximadamente 60 y aproximadamente 300 minutos, o entre aproximadamente 120 y 240 min, o entre aproximadamente 150 y 210 minutos, mientras la suspensión se agita de manera continua. En determinadas realizaciones, el proceso de extracción avanzará durante aproximadamente 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, o aproximadamente 300 minutos. En una realización preferida, el proceso de extracción avanzará durante al menos 160 minutos con agitación continua.

En algunas realizaciones, el tampón de extracción contiene fosfato de sodio monobásico 5 mM, acetato 5 mM y ácido acético glacial a del 0,051% al 0,06% (v/v). En algunas realizaciones, el precipitado de fracción II+III se extrae con una razón de pasta con respecto a tampón a o de aproximadamente 1:15 a un pH a o de aproximadamente 4,5 ± 0,2. En algunas realizaciones, la fracción II+III precipita en un tampón de disolución que contiene 600 ml de ácido acético glacial por 1000 l. En una realización particular, un tampón de extracción a modo de ejemplo puede contener fosfato de sodio monobásico 5 mM y acetato a o aproximadamente 5 mM a un pH de aproximadamente 4,5 ± 0,2 y una conductividad de a o aproximadamente 0,7 a 0,9 mS/cm.

El precipitado de fracción II+III extraído se trata luego mediante la adición de partículas de dióxido de sílice finamente divididas (por ejemplo, sílice pirogénica, Aerosil®) seguido de un periodo de incubación de 40 a 80 minutos durante el cual la suspensión se mezcla constantemente. En determinadas realizaciones, el periodo de incubación será de entre aproximadamente 50 minutos y aproximadamente 70 minutos, o aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 o más minutos. Generalmente, el tratamiento se realizará entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 10°C, o entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C. En determinadas realizaciones, el tratamiento puede realizarse a aproximadamente 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C o 10°C. En una realización particular, el tratamiento se realiza entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 10°C.

En algunas realizaciones, se añade sílice pirogénica hasta una concentración de entre aproximadamente 20 g/kg de pasta II+III y aproximadamente 100 g/kg de pasta II+III (es decir, para un precipitado de fracción II+III que se extrae en una razón de 1:15, debe añadirse sílice pirogénica hasta una concentración de desde aproximadamente 20 g/16 kg de suspensión II+III hasta aproximadamente 100 g/16 kg de suspensión II+III, o a una concentración final de aproximadamente el 0,125% (p/p) a aproximadamente el 0,625% (p/p)). En determinadas realizaciones, la sílice pirogénica puede añadirse a una concentración de aproximadamente 20 g/kg de pasta II+III, o aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 g/kg de pasta II+III. En una realización específica, se añade sílice pirogénica (por ejemplo, Aerosil 380 o equivalente) a la suspensión de fracción II+III modificada hasta una concentración final de aproximadamente 40 g/16 kg de II+III. Tiene lugar mezclado a de aproximadamente 2 a 8°C durante al menos de 50 a 70 minutos.

En algunas realizaciones, el tratamiento con sílice pirogénica incluye la adición de desde aproximadamente 0,01 kg/kg de pasta II+III hasta aproximadamente 0,07 kg/kg de pasta II+III, o desde aproximadamente 0,02 kg/kg de pasta II+III hasta aproximadamente 0,06 kg/kg de pasta II+III, o desde aproximadamente 0,03 kg/kg de pasta II+III hasta aproximadamente 0,05 kg/kg de pasta II+III, o aproximadamente 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06 ó 0,07 kg/kg de pasta II+III, y la mezcla se incubará durante entre aproximadamente 50 minutos y aproximadamente 70 minutos, o aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 o más minutos a una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C.

Para separar la fracción insoluble del precipitado de fracción II+III (es decir, la torta de filtro de dióxido de silicio de fracción II+III), la suspensión se filtra, normalmente usando filtración en profundidad. Los filtros de profundidad que pueden emplearse en los métodos proporcionados en el presente documento incluyen filtros de profundidad metálicos, de vidrio, cerámicos, orgánicos (tales como tierra de diatomeas) y similares. Los ejemplos de filtros adecuados incluyen, sin limitación, filtros Cuno 50SA, Cuno 90SA y Cuno VR06 (Cuno). Alternativamente, la etapa de separación puede realizarse mediante centrifugación en lugar de filtración.

En determinadas realizaciones, se añadirá adyuvante de filtración, por ejemplo Celpure C300 (Celpure) o Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), después del tratamiento con dióxido de sílice, para facilitar la filtración en profundidad. El adyuvante de filtro puede añadirse hasta una concentración final de desde aproximadamente 0,01 kg/kg de pasta II+III hasta aproximadamente 0,07 kg/kg de pasta II+III, o desde aproximadamente 0,02 kg/kg de pasta II+III hasta aproximadamente 0,06 kg/kg de pasta II+III, o desde aproximadamente 0,03 kg/kg de pasta II+III hasta aproximadamente 0,05 kg/kg de pasta II+III. En determinadas realizaciones, el adyuvante del filtro se añadirá a una concentración final de aproximadamente 0,01 kg/kg de pasta II+III, o aproximadamente 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06 ó 0,07 kg/kg de pasta II+III.

En algunas realizaciones, cuando la fracción soluble se separa de la fracción insoluble mediante filtración, el filtro se lava con entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 volúmenes del volumen muerto del filtro después de completarse la filtración. En determinadas realizaciones, el filtro se lavará con entre aproximadamente 3,5 volúmenes y aproximadamente 4,5 volúmenes, o al menos aproximadamente 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3,

3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0 volúmenes del volumen muerto del filtro. En una realización particular, el filtro prensa se lavará con al menos aproximadamente 3,6 volúmenes muertos de tampón de suspensión.

##### 5 E. Primera cromatografía de intercambio catiónico

En algunas realizaciones, se prepara una composición de inmunoglobulina IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) mediante la unión de inmunoglobulinas IgG aisladas de plasma (por ejemplo, plasma humano agrupado o una fracción del mismo, tal como una agrupación de plasma desprovisto de crioprecipitado, sobrenadante de fracción I, precipitado de fracción II+III o precipitado de precipitado G) a una resina de intercambio catiónico y la elución de manera diferencial de las inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) e IgG derivadas de plasma a granel. Esto crea dos composiciones de IgG, una que no está enriquecida para las inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral y otra que está enriquecida en las inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral). En una realización, la elución diferencial se logra eluyendo en primer lugar la mayor parte de las inmunoglobulinas IgG unidas del material de intercambio catiónico, y eluyendo posteriormente la IgG que permanece unida al material de intercambio catiónico en una segunda etapa de elución. En algunas realizaciones, ambas composiciones de IgG pueden purificarse y/o procesarse adicionalmente para crear composiciones de IgG con diferentes concentraciones relativas de inmunoglobulinas IgG individuales.

El pH y la conductividad óptimos usados durante la unión de inmunoglobulinas derivadas de plasma a un material de intercambio catiónico dependen de factores, incluyendo pero sin limitarse a, las características del material de intercambio catiónico que se usa. Un experto podrá determinar las condiciones de unión apropiadas que permitan que la mayoría (por ejemplo, al menos el 75%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%) del contenido de IgG se una al material de intercambio catiónico. Las condiciones exactas en las que se unen las IgG no son críticas, suponiendo que se una un contenido aceptable de IgG.

De mayor importancia son las condiciones en las que se eluyen las IgG. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento se basan en el descubrimiento de que las composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) pueden eluirse de manera diferencial del material de intercambio catiónico basándose en su afinidad aumentada. Dado que las IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) tienen una mayor afinidad por el material de intercambio catiónico (por ejemplo, material de intercambio catiónico débil tal como la resina de carboximetilo), puede realizarse una primera elución en condiciones de disoluciones moderadas (por ejemplo, fuerza iónica y pH) adecuadas para eluir la mayor parte de la IgG del intercambio catiónico y puede realizarse una segunda elución en condiciones de disolución más rigurosas (por ejemplo, mayor fuerza iónica y/o pH) para eluir un contenido de IgG, que permanece unido al material de intercambio catiónico después de la primera elución, enriquecido en las IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral)

En algunas realizaciones, la primera etapa de elución de intercambio catiónico se realiza usando un tampón de elución que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 3,0 mS/cm a 16,0 mS/cm. En algunas realizaciones, el pH de la primera etapa de elución de intercambio catiónico es de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 9,0 hasta aproximadamente 10,0. En algunas realizaciones, la primera elución de intercambio catiónico se realiza usando un tampón de elución que tiene un pH de aproximadamente  $4,5 \pm 0,5$ ,  $4,6 \pm 0,5$ ,  $4,7 \pm 0,5$ ,  $4,8 \pm 0,5$ ,  $4,9 \pm 0,5$ ,  $5,0 \pm 0,5$ ,  $5,1 \pm 0,5$ ,  $5,2 \pm 0,5$ ,  $5,3 \pm 0,5$ ,  $5,4 \pm 0,5$ ,  $5,5 \pm 0,5$ ,  $5,6 \pm 0,5$ ,  $5,7 \pm 0,5$ ,  $5,8 \pm 0,5$ ,  $5,9 \pm 0,5$ ,  $6,0 \pm 0,5$ ,  $6,1 \pm 0,5$ ,  $6,2 \pm 0,5$ ,  $6,3 \pm 0,5$ ,  $6,4 \pm 0,5$ ,  $6,5 \pm 0,5$ ,  $6,6 \pm 0,5$ ,  $6,7 \pm 0,5$ ,  $6,8 \pm 0,5$ ,  $6,9 \pm 0,5$ ,  $7,0 \pm 0,5$ ,  $7,1 \pm 0,5$ ,  $7,2 \pm 0,5$ ,  $7,3 \pm 0,5$ ,  $7,4 \pm 0,5$ ,  $7,5 \pm 0,5$ ,  $7,6 \pm 0,5$ ,  $7,7 \pm 0,5$ ,  $7,8 \pm 0,5$ ,  $7,9 \pm 0,5$ ,  $8,0 \pm 0,5$ ,  $8,1 \pm$

0,5, 8,2 ± 0,5, 8,3 ± 0,5, 8,4 ± 0,5, 8,5 ± 0,5, 8,6 ± 0,5, 8,7 ± 0,5, 8,8 ± 0,5, 8,9 ± 0,5, 9,0 ± 0,5, 9,1 ± 0,5, 9,2 ± 0,5, 9,3 ± 0,5, 9,4 ± 0,5 ó 9,5 ± 0,5.

5 En algunas realizaciones, la conductividad de la primera etapa de elución de intercambio catiónico es de aproximadamente 5 ± 2, 6 ± 2, 7 ± 2, 8 ± 2, 9 ± 2, 10 ± 2, 11 ± 2, 12 ± 2, 13 ± 2, 14 ± 2, 6 ± 3, 7 ± 3, 8 ± 3, 9 ± 3, 10 ± 3, 11 ± 3, 12 ± 3, 13 ± 3, 7 ± 4, 8 ± 4, 9 ± 4, 10 ± 4, 11 ± 4, 12 ± 4, 8 ± 5, 9 ± 5, 10 ± 5, 11 ± 5, 9 ± 6 ó 10 ± 6.

10 En una realización, la segunda etapa de elución de intercambio catiónico se realiza usando un segundo tampón de elución que tiene una mayor conductividad y/o un tampón de elución mayor que el usado en la primera etapa de elución catiónica. En algunas realizaciones, el segundo tampón de elución tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 10,0 mS/cm a 300 mS/cm. En algunas realizaciones, el pH de la segunda etapa de elución de intercambio catiónico es de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 9,0 hasta aproximadamente 10,0. En algunas realizaciones, la segunda elución de intercambio catiónico se realiza usando un tampón de elución que tiene un pH de aproximadamente 4,5 ± 0,5, 4,6 ± 0,5, 4,7, 4,8 ± 0,5, 4,9 ± 0,5, 5,0 ± 0,5, 5,1 ± 0,5, 5,2 ± 0,5, 5,3 ± 0,5, 5,4 ± 0,5, 5,5 ± 0,5, 5,6 ± 0,5, 5,7 ± 0,5, 5,8 ± 0,5, 5,9 ± 0,5, 6,0 ± 0,5, 6,1 ± 0,5, 6,2 ± 0,5, 6,3 ± 0,5, 6,4 ± 0,5, 6,5 ± 0,5, 6,6 ± 0,5, 6,7 ± 0,5, 6,8 ± 0,5, 6,9 ± 0,5, 7,0 ± 0,5, 7,1 ± 0,5, 7,2 ± 0,5, 7,3 ± 0,5, 7,4 ± 0,5, 7,5 ± 0,5, 7,6 ± 0,5, 7,7 ± 0,5, 7,8 ± 0,5, 7,9 ± 0,5, 8,0 ± 0,5, 8,1 ± 0,5, 8,2 ± 0,5, 8,3 ± 0,5, 8,4 ± 0,5, 8,5 ± 0,5, 8,6 ± 0,5, 8,7 ± 0,5, 8,8 ± 0,5, 8,9 ± 0,5, 9,0 ± 0,5, 9,1 ± 0,5, 9,2 ± 0,5, 9,3 ± 0,5, 9,4 ± 0,5 o 9,5 ± 0,5.

25 En algunas realizaciones, la conductividad de la segunda etapa de elución de intercambio catiónico es de aproximadamente 50 mS/cm a aproximadamente 250 mS/cm, desde aproximadamente 80 mS/cm hasta aproximadamente 200 mS/cm, desde aproximadamente 80 mS/cm hasta aproximadamente 150 mS/cm, desde aproximadamente 80 mS/cm hasta aproximadamente 120 mS/cm, o de aproximadamente 100 ± 80 mS/cm, 100 ± 60 mS/cm, 100 ± 40 mS/cm, 100 ± 20 mS/cm o 100 ± 10 mS/cm.

#### F. Reducción de conductividad / ajuste del pH

35 En algunas realizaciones, el eluato recuperado de la primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico, que contiene la fracción de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, tiene una concentración de sal relativamente alta, porque estas inmunoglobulinas se unen más fuertemente al material de intercambio catiónico que lo hace la fracción mayoritaria de las inmunoglobulinas IgG. En algunas realizaciones, cuando la siguiente etapa de purificación incluye unir la fracción de IgG enriquecida en proteínas relacionadas con enfermedad cerebral a un segundo material de intercambio iónico (por ejemplo, en una segunda etapa cromatográfica de intercambio catiónico), la conductividad de la composición se reduce para fomentar la unión. En algunas realizaciones, el pH de la disolución también se ajusta para mejorar la unión de las inmunoglobulinas y/o el poder de resolución de la etapa cromatográfica posterior. Los ejemplos no limitativos de métodos útiles para reducir la conductividad y/o ajustar el pH de la disolución incluyen diafiltración, ultrafiltración y diafiltración (UF/DF), diálisis, dilución, dilución y concentración, y cromatografía de filtración en gel/desalación.

45 En una realización, la conductividad del eluato recuperado de la primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico, que contiene la fracción de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, se reduce mediante una combinación de ultrafiltración, diafiltración y dilución. Los métodos, sistemas y membranas de ultra/diafiltración útiles para el intercambio de tampón y la concentración de inmunoglobulinas se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8.546.548 y la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2011/0213126).

55 En algunas realizaciones, la ultra/diafiltración se realiza usando un casete (por ejemplo, con un tamiz de canal abierto) y una membrana de ultra/diafiltración que tiene un punto de corte de peso molecular nominal (NMWCO) de no más de aproximadamente 150 kDa o no más de aproximadamente 140, 130, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40 ó 30 kDa. En una realización, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO de aproximadamente 30 kDa. En una realización, la membrana de ultra/diafiltración se usa con una geometría de tamiz A-Screen. En otra realización, la membrana de ultra/diafiltración se usa con una geometría de tamiz V-Screen.

60 En algunas realizaciones, el eluato recuperado de la primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico, que contiene la fracción de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, se ajusta a un pH de desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 7,0 y una conductividad de desde aproximadamente 1,0 mS/cm hasta aproximadamente 15 mS/cm antes de unir las inmunoglobulinas a una segunda resina de intercambio catiónico. En una realización, el eluato se ajusta a un pH de desde 5,0 hasta 6,0 y una conductividad de desde 1,0 mS/cm hasta 15 mS/cm. En otra realización, el eluato se ajusta a un pH de desde 5,0

65

hasta 6,0 y una conductividad de desde 3,0 mS/cm hasta 9,0 mS/cm. En otra realización, el eluato se ajusta a un pH de desde 5,0 hasta 6,0 y una conductividad de desde 8,0 mS/cm hasta 14,0 mS/cm. En otra realización, el eluato se ajusta a un pH de desde 5,0 hasta 5,5 y una conductividad de desde 3,0 mS/cm hasta 9,0 mS/cm. En otra realización, el eluato se ajusta a un pH de desde 5,0 hasta 5,5 y una conductividad de desde 8,0 mS/cm hasta 14,0 mS/cm. En otra realización, el eluato se ajusta a un pH de  $5,2 \pm 0,1$  y una conductividad de  $6,0 \pm 2$  mS/cm. En otra realización, el eluato se ajusta a un pH de  $5,2 \pm 0,1$  y una conductividad de  $11,0 \pm 2$ .

En algunas realizaciones, el pH del eluato se ajusta a  $5,0 \pm 0,2$ ,  $5,1 \pm 0,2$ ,  $5,2 \pm 0,2$ ,  $5,3 \pm 0,2$ ,  $5,4 \pm 0,2$ ,  $5,5 \pm 0,2$ ,  $5,6 \pm 0,2$ ,  $5,7 \pm 0,2$ ,  $5,8 \pm 0,2$ ,  $5,9 \pm 0,2$ ,  $6,0 \pm 0,2$ ,  $6,1 \pm 0,2$ ,  $6,2 \pm 0,2$ ,  $6,3 \pm 0,2$ ,  $6,4 \pm 0,2$ ,  $6,5 \pm 0,2$ ,  $6,6 \pm 0,2$ ,  $6,7 \pm 0,2$ ,  $6,8 \pm 0,2$ ,  $6,9 \pm 0,2$ ,  $7,0 \pm 0,2$ ,  $5,0 \pm 0,1$ ,  $5,1 \pm 0,1$ ,  $5,2 \pm 0,1$ ,  $5,3 \pm 0,1$ ,  $5,4 \pm 0,1$ ,  $5,5 \pm 0,1$ ,  $5,6 \pm 0,1$ ,  $5,7 \pm 0,1$ ,  $5,8 \pm 0,1$ ,  $5,9 \pm 0,1$ ,  $6,0 \pm 0,1$ ,  $6,1 \pm 0,1$ ,  $6,2 \pm 0,1$ ,  $6,3 \pm 0,1$ ,  $6,4 \pm 0,1$ ,  $6,5 \pm 0,1$ ,  $6,6 \pm 0,1$ ,  $6,7 \pm 0,1$ ,  $6,8 \pm 0,1$ ,  $6,9 \pm 0,1$  ó  $7,0 \pm 0,1$ .

En algunas realizaciones, la conductividad del eluato se ajusta a  $3,0 \pm 2$  mS/cm,  $4,0 \pm 2$  mS/cm,  $5,0 \pm 2$  mS/cm,  $6,0 \pm 2$  mS/cm,  $7,0 \pm 2$  mS/cm,  $8,0 \pm 2$  mS/cm,  $9,0 \pm 2$  mS/cm,  $10 \pm 2$  mS/cm,  $11 \pm 2$  mS/cm,  $12 \pm 2$  mS/cm,  $13 \pm 2$  mS/cm,  $14 \pm 2$  mS/cm,  $2,0 \pm 1$  mS/cm,  $3,0 \pm 1$  mS/cm,  $4,0 \pm 1$  mS/cm,  $5,0 \pm 1$  mS/cm,  $6,0 \pm 1$  mS/cm,  $7,0 \pm 1$  mS/cm,  $8,0 \pm 1$  mS/cm,  $9,0 \pm 1$  mS/cm,  $10 \pm 1$  mS/cm,  $11 \pm 1$  mS/cm,  $12 \pm 1$  mS/cm,  $13 \pm 1$  mS/cm,  $14 \pm 1$  mS/cm, o  $15 \pm 1$  mS/cm.

En algunas realizaciones, el eluato recuperado de la primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico, que contiene la fracción de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, se concentra hasta una concentración de proteína de desde aproximadamente 2 g/l (0,2%) hasta aproximadamente 100 g/l (10%) antes de unir las inmunoglobulinas a una segunda resina de intercambio catiónico. En una realización, el eluato se concentra hasta una concentración de proteína de desde aproximadamente 5 g/l (0,5%) hasta aproximadamente 50 g/l (5%). En una realización, el eluato se concentra hasta una concentración de proteína de desde aproximadamente 2 g/l (0,2%) hasta aproximadamente 50 g/l (5%). En una realización, el eluato se concentra hasta una concentración de proteína de desde 10 g/l (1%) hasta 50 g/l (5%). En una realización, el eluato se concentra hasta una concentración de proteína de desde 10 g/l (1%) hasta 30 g/l (3%). En algunas realizaciones, el eluato se concentra hasta una concentración de proteína de 2 g/l (0,2%), 3 g/l (0,3%), 4 g/l (0,4%), 5 g/l (0,5%), 6 g/l (0,6%), 7 g/l (0,7%), 8 g/l (0,8%), 9 g/l (0,9%), 10 g/l (1%), 12,5 g/l (1,25%), 15 g/l (1,5%), 17,5 g/l (1,75%), 20 g/l (2%), 25 g/l (2,5%), 30 g/l (3%), 35 g/l (3,5%), 40 g/l (4%), 45 g/l (4,5%), 50 g/l (5%), 55 g/l (5,5%), 60 g/l (6%), 65 g/l (6,5%), 70 g/l (7%), 75 g/l (7,5%), 80 g/l (8%), 85 g/l (8,5%), 90 g/l (9%), 95 g/l (9,5%) o 100 g/l (10%).

En una realización, el eluato se ajusta a un pH de desde 5,0 hasta 5,5, una conductividad de desde 3,0 mS/cm hasta 9,0 mS/cm y una concentración de proteína de desde 5 g/l (0,5%) hasta 50 g/l (5%) antes de unir las inmunoglobulinas a una segunda resina de intercambio catiónico. En una realización, el eluato se ajusta a un pH de desde 5,0 hasta 5,5, una conductividad de desde 8,0 mS/cm hasta 14,0 mS/cm, y una concentración de proteína de desde 5 g/l (0,5%) hasta 50 g/l (5%) antes de unir las inmunoglobulinas a una segunda resina de intercambio catiónico.

#### G. Segunda cromatografía de intercambio catiónico

En algunas realizaciones, una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral), por ejemplo, tal como se aíslan usando una etapa cromatográfica de intercambio catiónico descrita anteriormente, se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico. En algunas realizaciones, el método incluye unir la composición de IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral a un material de intercambio catiónico (por ejemplo, un material de intercambio catiónico débil tal como una resina de carboximetilo, por ejemplo, resina CM Sepharose o CM HyperD), opcionalmente lavando impurezas unidas débilmente al material de intercambio catiónico en una etapa de lavado y eluyendo las inmunoglobulinas IgG del material de intercambio catiónico. En una realización, el material de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo. En una realización, la resina de carboximetilo es resina CM HyperD.

En algunas realizaciones, la etapa de unión se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 1 a 15 mS/cm. En algunas realizaciones, la etapa de unión se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 10,0. En algunas realizaciones, la primera elución de intercambio catiónico se realiza usando un tampón de elución que tiene un pH de aproximadamente  $4,5 \pm 0,5$ ,  $4,6 \pm 0,5$ ,  $4,7 \pm 0,5$ ,  $4,8 \pm 0,5$ ,  $4,9 \pm 0,5$ , 5,0

## ES 2 763 396 T3

$\pm 0,5$ ,  $5,1 \pm 0,5$ ,  $5,2 \pm 0,5$ ,  $5,3 \pm 0,5$ ,  $5,4 \pm 0,5$ ,  $5,5 \pm 0,5$ ,  $5,6 \pm 0,5$ ,  $5,7 \pm 0,5$ ,  $5,8 \pm 0,5$ ,  $5,9 \pm 0,5$ ,  $6,0 \pm 0,5$ ,  $6,1 \pm 0,5$ ,  $6,2 \pm 0,5$ ,  $6,3 \pm 0,5$ ,  $6,4 \pm 0,5$ ,  $6,5 \pm 0,5$ ,  $6,6 \pm 0,5$ ,  $6,7 \pm 0,5$ ,  $6,8 \pm 0,5$ ,  $6,9 \pm 0,5$ ,  $7,0 \pm 0,5$ ,  $7,1 \pm 0,5$ ,  $7,2 \pm 0,5$ ,  $7,3 \pm 0,5$ ,  $7,4 \pm 0,5$ ,  $7,5 \pm 0,5$ ,  $7,6 \pm 0,5$ ,  $7,7 \pm 0,5$ ,  $7,8 \pm 0,5$ ,  $7,9 \pm 0,5$ ,  $8,0 \pm 0,5$ ,  $8,1 \pm 0,5$ ,  $8,2 \pm 0,5$ ,  $8,3 \pm 0,5$ ,  $8,4 \pm 0,5$ ,  $8,5 \pm 0,5$ ,  $8,6 \pm 0,5$ ,  $8,7 \pm 0,5$ ,  $8,8 \pm 0,5$ ,  $8,9 \pm 0,5$ ,  $9,0 \pm 0,5$ ,  $9,1 \pm 0,5$ ,  $9,2 \pm 0,5$ ,  $9,3 \pm 0,5$ ,  $9,4 \pm 0,5$  ó  $9,5 \pm 0,5$ .

5 En algunas realizaciones, la etapa de unión se realiza en condiciones de disolución que tienen una conductividad de aproximadamente  $3 \pm 2$ ,  $4 \pm 2$ ,  $5 \pm 2$ ,  $6 \pm 2$ ,  $7 \pm 2$ ,  $8 \pm 2$ ,  $9 \pm 2$ ,  $10 \pm 2$ ,  $11 \pm 2$ ,  $12 \pm 2$ ,  $13 \pm 2$ ,  $14 \pm 2$ ,  $4 \pm 3$ ,  $5 \pm 3$ ,  $6 \pm 3$ ,  $7 \pm 3$ ,  $8 \pm 3$ ,  $9 \pm 3$ ,  $10 \pm 3$ ,  $11 \pm 3$ ,  $12 \pm 3$ ,  $13 \pm 3$ ,  $5 \pm 4$ ,  $6 \pm 4$ ,  $7 \pm 4$ ,  $8 \pm 4$ ,  $9 \pm 4$ ,  $10 \pm 4$ ,  $11 \pm 4$ ,  $12 \pm 4$ ,  $6 \pm 5$ ,  $7 \pm 5$ ,  $8 \pm 5$ ,  $9 \pm 5$ ,  $10 \pm 5$ ,  $11 \pm 5$ ,  $7 \pm 6$ ,  $8 \pm 6$ ,  $9 \pm 6$ ,  $10 \pm 6$ ,  $8 \pm 7$  ó  $9 \pm 7$ .

10 En una realización, la etapa de unión se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 7,0 y una conductividad de desde aproximadamente 1,0 mS/cm hasta aproximadamente 15 mS/cm. En una realización, la etapa de unión se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 5,0 hasta 6,0 y una conductividad de desde 1,0 mS/cm hasta 15 mS/cm. En otra realización, la etapa de unión se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 5,0 hasta 6,0 y una conductividad de desde 3,0 mS/cm hasta 9,0 mS/cm. En otra realización, la etapa de unión se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 5,0 hasta 6,0 y una conductividad de desde 8,0 mS/cm hasta 14,0 mS/cm. En otra realización, la etapa de unión se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 5,0 hasta 5,5 y una conductividad de desde 3,0 mS/cm hasta 9,0 mS/cm. En otra realización, la etapa de unión se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 5,0 hasta 5,5 y una conductividad de desde 8,0 mS/cm hasta 14,0 mS/cm. En otra realización, la etapa de unión se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de  $5,2 \pm 0,1$  y una conductividad de  $6,0 \pm 2$  mS/cm. En otra realización, la etapa de unión se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de  $5,2 \pm 0,1$  y una conductividad de  $11,0 \pm 2$ .

25 En algunas realizaciones, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 15,0 mS/cm a 300 mS/cm. En algunas realizaciones, el tampón de elución tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 10,0 mS/cm a 300 mS/cm. En algunas realizaciones, el pH de la etapa de elución es de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 10,0, o desde aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 9,0, o desde aproximadamente 9,0 hasta aproximadamente 10,0. En algunas realizaciones, el pH de la etapa de elución es de aproximadamente  $4,5 \pm 0,5$ ,  $4,6 \pm 0,5$ ,  $4,7$ ,  $4,8 \pm 0,5$ ,  $4,9 \pm 0,5$ ,  $5,0 \pm 0,5$ ,  $5,1 \pm 0,5$ ,  $5,2 \pm 0,5$ ,  $5,3 \pm 0,5$ ,  $5,4 \pm 0,5$ ,  $5,5 \pm 0,5$ ,  $5,6 \pm 0,5$ ,  $5,7 \pm 0,5$ ,  $5,8 \pm 0,5$ ,  $5,9 \pm 0,5$ ,  $6,0 \pm 0,5$ ,  $6,1 \pm 0,5$ ,  $6,2 \pm 0,5$ ,  $6,3 \pm 0,5$ ,  $6,4 \pm 0,5$ ,  $6,5 \pm 0,5$ ,  $6,6 \pm 0,5$ ,  $6,7 \pm 0,5$ ,  $6,8 \pm 0,5$ ,  $6,9 \pm 0,5$ ,  $7,0 \pm 0,5$ ,  $7,1 \pm 0,5$ ,  $7,2 \pm 0,5$ ,  $7,3 \pm 0,5$ ,  $7,4 \pm 0,5$ ,  $7,5 \pm 0,5$ ,  $7,6 \pm 0,5$ ,  $7,7 \pm 0,5$ ,  $7,8 \pm 0,5$ ,  $7,9 \pm 0,5$ ,  $8,0 \pm 0,5$ ,  $8,1 \pm 0,5$ ,  $8,2 \pm 0,5$ ,  $8,3 \pm 0,5$ ,  $8,4 \pm 0,5$ ,  $8,5 \pm 0,5$ ,  $8,6 \pm 0,5$ ,  $8,7 \pm 0,5$ ,  $8,8 \pm 0,5$ ,  $8,9 \pm 0,5$ ,  $9,0 \pm 0,5$ ,  $9,1 \pm 0,5$ ,  $9,2 \pm 0,5$ ,  $9,3 \pm 0,5$ ,  $9,4 \pm 0,5$  ó  $9,5 \pm 0,5$ .

45 En algunas realizaciones, la conductividad de la etapa de elución es de desde aproximadamente 50 mS/cm hasta aproximadamente 250 mS/cm, desde aproximadamente 80 mS/cm hasta aproximadamente 200 mS/cm, desde aproximadamente 80 mS/cm hasta aproximadamente 150 mS/cm, desde aproximadamente 80 mS/cm hasta aproximadamente 120 mS/cm, o de aproximadamente  $100 \pm 80$  mS/cm,  $100 \pm 60$  mS/cm,  $100 \pm 40$  mS/cm,  $100 \pm 20$  mS/cm o  $100 \pm 10$  mS/cm. Generalmente, la conductividad usada para eluir las inmunoglobulinas de la segunda resina de intercambio catiónico dependerá del pH usado, y viceversa. Por ejemplo, cuando el pH de la condición de elución es menor (por ejemplo, inferior a 7,0), se necesitará una mayor conductividad para eluir las inmunoglobulinas. Por el contrario, cuando el pH de la condición de elución es mayor (por ejemplo, superior a 7,0), una menor conductividad será suficiente para eluir las inmunoglobulinas. El experto en la técnica apreciará cómo ajustar el pH y la conductividad de las condiciones de elución de manera apropiada.

55 En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 7,0 hasta 10 y una conductividad mayor de 10 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 7,0 hasta 10 y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 100 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 7,0 hasta 10 y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 50 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 7,0 hasta 10 y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 25 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 7,0 hasta 10 y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 15 mS/cm.

65 En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 8,0 hasta 9,0 y una conductividad mayor de 10 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 8,0 hasta 9,0 y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 100 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 8,0 hasta 9,0

y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 50 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 8,0 hasta 9,0 y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 25 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 8,0 hasta 9,0 y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 15 mS/cm.

En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de  $8,5 \pm 0,2$  y una conductividad mayor de 10 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de  $8,5 \pm 0,2$  y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 100 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de  $8,5 \pm 0,2$  y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 50 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de  $8,5 \pm 0,2$  y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 25 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de  $8,5 \pm 0,2$  y una conductividad de desde 10 mS/cm hasta 15 mS/cm. En una realización, la etapa de elución se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de  $8,5 \pm 0,2$  y una conductividad de desde  $13 \pm 2$  mS/cm.

#### H. Reducción de conductividad / ajuste del pH

En algunas realizaciones, el eluato recuperado de la segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico, que contiene la fracción de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, tiene una conductividad relativamente alta. En algunas realizaciones, cuando la siguiente etapa de purificación incluye unir impurezas de la fracción de IgG enriquecida en proteínas relacionadas con enfermedad cerebral a un material de intercambio aniónico, la conductividad de la composición se reduce para fomentar la unión. En algunas realizaciones, el pH de la disolución también se ajusta para mejorar la unión de las impurezas, mientras que las inmunoglobulinas fluyen a través de la resina. Los ejemplos no limitativos de métodos útiles para reducir la conductividad y/o ajustar el pH de la disolución incluyen diafiltración, ultrafiltración y diafiltración (UF/DF), diálisis, dilución, dilución y concentración, y cromatografía de filtración en gel/desalación. En una realización, la conductividad del eluato se reduce mediante dilución.

En algunas realizaciones, la ultra/diafiltración se realiza usando un casete (por ejemplo, con un tamiz de canal abierto) y una membrana de ultra/diafiltración que tiene un punto de corte de peso molecular nominal (NMWCO) de no más de aproximadamente 150 kDa o no más de aproximadamente 140, 130, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40 ó 30 kDa. En una realización, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO de aproximadamente 30 kDa. En una realización, la membrana de ultra/diafiltración se usa con una geometría de A-Screen. En otra realización, la membrana de ultra/diafiltración se usa con una geometría de V-Screen.

En una realización, el eluato recuperado de la segunda etapa de cromatografía de intercambio catiónico se ajusta a un pH de desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5 y una conductividad de desde aproximadamente 0,5 mS/cm hasta aproximadamente 15 mS/cm antes de unir las inmunoglobulinas a un material de intercambio aniónico. En una realización, el eluato se ajusta a un pH de desde 5,9 hasta 6,9 y una conductividad de desde 1,0 mS/cm hasta 15 mS/cm. En otra realización, el eluato se ajusta a un pH de desde 5,9 hasta 6,9 y una conductividad de desde 1,0 mS/cm hasta 5,0 mS/cm. En otra realización, el eluato se ajusta a un pH de  $6,4 \pm 0,2$  y una conductividad de desde 1,0 mS/cm hasta 5,0 mS/cm. En otra realización, el eluato se ajusta a un pH de  $6,4 \pm 0,2$  y una conductividad de  $2,2 \pm 1$  mS/cm.

En algunas realizaciones, el pH del eluato se ajusta a  $5,5 \pm 0,2$ ,  $5,6 \pm 0,2$ ,  $5,7 \pm 0,2$ ,  $5,8 \pm 0,2$ ,  $5,9 \pm 0,2$ ,  $6,0 \pm 0,2$ ,  $6,1 \pm 0,2$ ,  $6,2 \pm 0,2$ ,  $6,3 \pm 0,2$ ,  $6,4 \pm 0,2$ ,  $6,5 \pm 0,2$ ,  $6,6 \pm 0,2$ ,  $6,7 \pm 0,2$ ,  $6,8 \pm 0,2$ ,  $6,9 \pm 0,2$ ,  $7,0 \pm 0,2$ ,  $7,1 \pm 0,2$ ,  $7,2 \pm 0,2$ ,  $7,3 \pm 0,2$ ,  $7,4 \pm 0,2$ ,  $7,5 \pm 0,2$ ,  $5,5 \pm 0,1$ ,  $5,6 \pm 0,1$ ,  $5,7 \pm 0,1$ ,  $5,8 \pm 0,1$ ,  $5,9 \pm 0,1$ ,  $6,0 \pm 0,1$ ,  $6,1 \pm 0,1$ ,  $6,2 \pm 0,1$ ,  $6,3 \pm 0,1$ ,  $6,4 \pm 0,1$ ,  $6,5 \pm 0,1$ ,  $6,6 \pm 0,1$ ,  $6,7 \pm 0,1$ ,  $6,8 \pm 0,1$ ,  $6,9 \pm 0,1$ ,  $7,0 \pm 0,1$ ,  $7,1 \pm 0,1$ ,  $7,2 \pm 0,1$ ,  $7,3 \pm 0,1$ ,  $7,4 \pm 0,1$  ó  $7,5 \pm 0,1$ .

En algunas realizaciones, la conductividad del eluato se ajusta a  $2,0 \pm 1$  mS/cm,  $3,0 \pm 1$  mS/cm,  $4,0 \pm 1$  mS/cm,  $5,0 \pm 1$  mS/cm,  $6,0 \pm 1$  mS/cm,  $7,0 \pm 1$  mS/cm,  $8,0 \pm 1$  mS/cm,  $9,0 \pm 1$  mS/cm,  $10 \pm 1$  mS/cm,  $11 \pm 1$  mS/cm,  $12 \pm 1$  mS/cm,  $13 \pm 1$  mS/cm,  $14 \pm 1$  mS/cm ó  $15 \pm 1$  mS/cm.

#### I. Cromatografía de intercambio aniónico

En algunas realizaciones, una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral), por ejemplo, tal como se aíslan usando la etapa cromatográfica de intercambio catiónico descrita anteriormente y, opcionalmente, se purifican adicionalmente según la segunda etapa cromatográfica de intercambio catiónico descrita anteriormente, se purifica adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico. Puede usarse cualquier resina de intercambio aniónico adecuada en los métodos proporcionados en el presente documento. Los ejemplos no limitativos de resinas de intercambio aniónico adecuadas para su uso incluyen resinas de dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE), amonio cuaternario (Q) y

dietilaminopropilo (ANX). En una realización, la resina de intercambio aniónico es una resina ANX. En una realización, la resina ANX es resina ANX Sepharose ff.

5 En algunas realizaciones, el método incluye aplicar la composición de IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral a una columna de intercambio aniónico y recoger la fracción no retenida, que contiene las inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral. En algunas realizaciones, esta etapa cromatográfica de intercambio aniónico de fracción no retenida se realiza en condiciones de disolución que incluyen un pH de 5,0 a 8,0 y una conductividad de 0,5 mS/cm a 5,0 mS/cm.

10 En algunas realizaciones, la etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, o desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 6,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 8,0, o desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 7,0, o desde aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 8,0. En algunas realizaciones, la etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de aproximadamente 5,5 ± 0,5, 5,6 ± 0,5, 5,7 ± 0,5, 5,8 ± 0,5, 5,9 ± 0,5, 6,0 ± 0,5, 6,1 ± 0,5, 6,2 ± 0,5, 6,3 ± 0,5, 6,4 ± 0,5, 6,5 ± 0,5, 6,6 ± 0,5, 6,7 ± 0,5, 6,8 ± 0,5, 6,9 ± 0,5, 7,0 ± 0,5, 7,1 ± 0,5, 7,2 ± 0,5, 7,3 ± 0,5, 7,4 ± 0,5 ó 7,5 ± 0,5.

15 En algunas realizaciones, la etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico se realiza en condiciones de disolución que tienen una conductividad de aproximadamente 1,0 ± 0,5, 1,5 ± 0,5, 2,5 ± 0,5, 3,0 ± 0,5, 3,5 ± 0,5, 4,0, ± 0,5 4,5 ± 0,5, 1,5 ± 1, 2,0 ± 1, 2,5 ± 1, 3,0 ± 1, 3,5 ± 1, 4,0 ± 1, 2,0 ± 1,5, 2,5 ± 1,5, 3,0 ± 1,5, 3,5 ± 1,5, 2,5 ± 2 ó 3,0 ± 2.

20 En una realización, la etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde aproximadamente 5,5 hasta aproximadamente 7,5 y una conductividad de desde aproximadamente 0,5 mS/cm hasta aproximadamente 15 mS/cm. En una realización, la etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 5,9 hasta 6,9 y una conductividad de desde 1,0 mS/cm hasta 15 mS/cm. En otra realización, la etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de desde 5,9 hasta 6,9 y una conductividad de desde 1,0 mS/cm hasta 5,0 mS/cm. En otra realización, la etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de 6,4 ± 0,2 y una conductividad de desde 1,0 mS/cm hasta 5,0 mS/cm. En otra realización, la etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico se realiza en condiciones de disolución que tienen un pH de 6,4 ± 0,2 y una conductividad de 2,2 ± 1 mS/cm.

#### 35 J. Eliminación e inactivación viral

35 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento para la preparación de una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-Aβ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti-α-sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) incluyen al menos una, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente tres etapas de inactivación y/o eliminación viral. Los ejemplos no limitativos de etapas de inactivación o eliminación viral que pueden emplearse con los métodos proporcionados en el presente documento incluyen el tratamiento con disolventes / detergentes (Horowitz *et al.*, Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Supl. 3):S21-S28 y Kreil *et al.*, Transfusion 2003 (43):1023-1028), nanofiltración (Hamamoto *et al.*, Vox Sang 1989 (56)230-236 y Yuasa *et al.*, J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024) e incubación a bajo pH a altas temperaturas (Kempf *et al.*, Transfusion 1991 (31)423-427 y Louie *et al.*, Biologicals 1994 (22):13-19). En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen etapas de tratamiento con S/D, nanofiltración e incubación a bajo pH.

40 Las etapas de inactivación o eliminación viral pueden realizarse en una composición de IgG enriquecida final y/o en cualquier composición de IgG enriquecida intermedia generada durante el proceso de fabricación. Por ejemplo, en una realización, puede realizarse una etapa de inactivación o eliminación viral en un sobrenadante de fracción I, un extracto de torta de filtro de dióxido de silicio de fracción II+III, una fracción de eluato de intercambio catiónico, una fracción no retenida de intercambio aniónico, un producto de ultrafiltración o diafiltración, etc.

#### 55 1. Tratamiento con disolventes y detergentes (S/D)

55 Para inactivar diversos contaminantes virales que pueden estar presentes en productos derivados de plasma o recombinantes, una o más composiciones intermedias de IgG enriquecidas pueden someterse a un tratamiento con disolventes / detergentes (S/D). Los métodos para el tratamiento con detergentes de fracciones derivadas de plasma se conocen bien en la técnica (para su revisión, véase, Pelletier JP *et al.*, Best Pract Res Clin Haematol. 2006; 19(1): 205-42). En general, cualquier tratamiento con S/D convencional puede usarse junto con los métodos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, a continuación se proporciona un protocolo a modo de ejemplo para un tratamiento con S/D.

65 En algunas realizaciones, se añaden Triton X-100, Tween-20 y fosfato de tri(n-butilo) (TNBP) a una composición

intermedia de factor H a concentraciones finales de a o aproximadamente el 1,0%, el 0,3% y 0,3%, respectivamente. La mezcla se agita luego a una temperatura de entre aproximadamente 18°C y aproximadamente 25°C durante al menos aproximadamente una hora.

- 5 En una realización, los reactivos S/D (por ejemplo, Triton X-100, Tween-20 y TNBP) se añaden mediante pulverización en lugar de mediante adición de fluidos. En otras realizaciones, los reactivos detergentes pueden añadirse como sólidos a la disolución intermedia de IgG enriquecida, que está mezclándose para asegurar una distribución rápida de los componentes S/D. En determinadas realizaciones, es preferible añadir reactivos sólidos rociando los sólidos sobre un área de superficie deslocalizada del filtrado de tal manera que no se produzca una  
10 sobreconcentración local, tal como en la adición de fluidos. En otra realización, la disolución de IgG enriquecida se bombea a un tanque en el que ya están presentes los reactivos S/D en forma o bien concentrada o bien diluida.

## 2. Nanofiltración

- 15 En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen la nanofiltración de una composición de IgG enriquecida, o un producto intermedio de la misma, usando un dispositivo de nanofiltración adecuado. En determinadas realizaciones, el dispositivo de nanofiltración tendrá un tamaño de poro medio de desde aproximadamente 15 nm hasta aproximadamente 100 nm. Los ejemplos de nanofiltros adecuados para este uso incluyen, sin limitación, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N y 75N (Planova). En algunas realizaciones, el nanofiltro tiene un tamaño de poro medio de desde aproximadamente  
20 15 nm hasta aproximadamente 72 nm, o de desde aproximadamente 19 nm hasta aproximadamente 35 nm, o de aproximadamente 15 nm, 19 nm, 35 nm o 72 nm. En algunas realizaciones, el nanofiltro tiene un tamaño de poro medio de aproximadamente 19 nm, tal como un filtro Asahi PLANOVA 35N, o equivalente del mismo.

## 3. Incubación a bajo pH

- En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida, o un producto intermedio de la misma, se incuba a bajo pH para reducir o inactivar la carga viral de la composición. En una realización, esto se logra ajustando el pH de la composición a bajo pH, por ejemplo, menor de a o aproximadamente 6,0, e incubando durante al menos  
30 aproximadamente una semana antes de liberar la composición. En una realización preferida, el pH de la disolución a granel se ajusta a menos de a o aproximadamente 5,5 antes de la incubación. En una realización más preferida, el pH de la disolución se reduce hasta menos de a o aproximadamente 5,0 antes de la incubación. En determinadas realizaciones, el pH de la disolución se reduce hasta menos de a o aproximadamente 6,0 o menos de a o aproximadamente 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0 o inferior  
35 antes de la incubación.

- En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida, o un producto intermedio de la misma, se incuba durante al menos aproximadamente una semana, o al menos aproximadamente 2, 3, 4 o más semanas, o durante al menos aproximadamente 1, 2, 3 o más meses. En algunas realizaciones, la composición se incuba a una temperatura superior a aproximadamente 20°C, o superior a aproximadamente 25°C, o superior a aproximadamente 30°C. En algunas realizaciones, la composición se incuba a una temperatura de a o aproximadamente 20°C, o de a o aproximadamente 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, o mayor.

## 4. Liofilización y tratamiento térmico

- En algunas realizaciones, en las que se liofiliza la composición de IgG enriquecida en la IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral), el método para preparar la composición incluye el tratamiento térmico de la composición liofilizada. Los tratamientos térmicos para la inactivación viral en composiciones de factores sanguíneos se conocen bien en la técnica (por ejemplo, véanse, Piszkiwicz *et al.*, Thromb Res. 15 de julio de 1987; 47(2):235-41; Piszkiwicz *et al.*, Curr Stud Hematol Blood Transfus. 1989; (56):44-54; Epstein y Fricke, Arch Pathol Lab Med. marzo de 1990; 114 (3):335-40).

## K. Ultrafiltración y diafiltración

- En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento incluyen una etapa de ultrafiltración para concentrar y/o formular la composición de IgG enriquecida en IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral). En algunas realizaciones, la ultrafiltración se realiza usando un casete (por ejemplo, con un tamiz de canal abierto) y una membrana de ultrafiltración que tiene un punto de corte de peso molecular nominal (NMWCO) de menos de aproximadamente 150 kDa o menos de aproximadamente 140, 130, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40 ó 30 kDa. En algunas realizaciones, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO de no más de 50 kDa. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en IgG anti-proteína relacionada con

enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) se concentra hasta una concentración de proteína final de a o aproximadamente entre el 0,5% y el 25% (p/v), o a o aproximadamente entre el 1% y el 25% (p/v), o a o aproximadamente entre el 2% y el 20% (p/v), o a o aproximadamente entre el 3% y el 15% (p/v), o a o aproximadamente entre el 5% y el 10% (p/v), o a o aproximadamente entre el 9% y el 12%, o a o aproximadamente entre el 3% y el 7% (p/v), o a o aproximadamente entre el 8% y el 14% (p/v), o a o aproximadamente entre el 4% y el 6% o aproximadamente, o hasta una concentración final de a o aproximadamente el 0,1%, el 0,25%, el 0,5%, el 1%, el 2%, el 3%, el 4%, el 5% o el 6%, el 7%, el 8%, el 9%, el 10%, el 11%, el 12%, el 13%, el 14%, el 15%, el 16%, el 17%, el 18%, el 19%, el 20%, el 21%, el 22%, el 23%, el 24%, el 25% o más.

En algunas realizaciones, antes y/o después de la ultrafiltración, puede realizarse intercambio de tampón mediante diafiltración frente a una disolución adecuada para vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal u otra vía apropiada para la administración de IgG. Normalmente, el volumen de intercambio mínimo es de al menos aproximadamente 3 veces el volumen de concentrado original o al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más veces el volumen de concentrado original.

En una realización, la ultra/diafiltración se realiza antes de una etapa de reducción viral, por ejemplo, nanofiltración. En otra realización, la ultra/diafiltración se realiza después de una etapa de reducción viral, por ejemplo, nanofiltración. En una realización, se realiza una etapa de reducción viral a bajo pH después de la etapa de ultra/diafiltración, por ejemplo, mientras la composición está presente en su formulación final.

#### IV. Composiciones de IgG derivadas de plasma

En un aspecto, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral es una composición acuosa. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral se formula para la administración farmacéutica, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intranasal o cualquier otra vía apropiada para la administración terapéutica de IgG.

Los portadores y excipientes farmacéuticos, así como las formulaciones farmacéuticas adecuadas, se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer *et al.*, Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe *et al.*, Pharmaceutical Press (2000)).

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral puede formularse en forma soluble estable o liofilizada. La composición de IgG puede liofilizarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes de su uso mediante la adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones de la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral se administran al individuo mediante cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar la composición por cualquier vía conveniente. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento se administran de manera sistémica. Para uso sistémico, según algunas realizaciones, la IgG se formula para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal, intravítrea o transdérmica) o enteral (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) según métodos convencionales. Las formulaciones pueden administrarse de manera continua mediante infusión o mediante inyección en bolo. Algunas formulaciones abarcan sistemas de liberación lenta. Las vías de administración preferidas dependerán de la indicación que esté tratándose, manejándose o previniéndose. Un médico experto podrá determinar fácilmente la vía de administración preferida para la afección particular que esté tratándose, manejándose o previniéndose.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ) es una inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un confórmero de  $\beta$ -amiloide (por ejemplo, un monómero de A $\beta$ 42, una CAPS de A $\beta$ 40 y/o una fibrilla de A $\beta$ 40) que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En

algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un confórmero de  $\beta$ -amiloide que una composición de IgG total preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide de alto título se enriquece para un anticuerpo anti- $\beta$ -amiloide en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti- $\beta$ -amiloide en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-beta-amiloide 40 (anti-A $\beta$  40) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-beta-amiloide 40 (anti-A $\beta$  40) es una inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide 40 de alto título en una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide 40 de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítipo de  $\beta$ -amiloide 40 que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide 40 de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítipo de  $\beta$ -amiloide 40 que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide 40 de alto título enriquecida para un anticuerpo anti- $\beta$ -amiloide 40 en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti- $\beta$ -amiloide 40 en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-beta-amiloide 42 (anti-A $\beta$  42) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-beta-amiloide 42 (anti-A $\beta$  42) es una inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide 42 de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide 42 de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítipo de  $\beta$ -amiloide 42 que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide 42 de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítipo de  $\beta$ -amiloide 42 que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\beta$ -amiloide 42 de alto título se enriquece para un anticuerpo anti- $\beta$ -amiloide 42 en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti- $\beta$ -amiloide 42 en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-beta-amiloide 40 (anti-oligómeros de A $\beta$  40) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-oligómeros de A $\beta$  40 (anti-oligómeros de A $\beta$  40) es una inmunoglobulina G agrupada anti-oligómeros de A $\beta$  40 de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti-oligómeros de A $\beta$  40 de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítipo de oligómeros de A $\beta$  40 que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-oligómeros de A $\beta$  40 de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítipo de oligómeros de A $\beta$  40 que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-oligómeros de A $\beta$  40 de alto título se enriquece para un anticuerpo anti-oligómeros de A $\beta$  40 en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti-oligómeros de A $\beta$  40 en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-fibrillas de beta-amiloide 40 (anti-fibrillas de A $\beta$  40) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-fibrillas de beta-amiloide 40 (anti-fibrillas de A $\beta$  40), es una inmunoglobulina G agrupada anti-fibrillas de A $\beta$  40 de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti-fibrillas de A $\beta$  40 de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítipo de fibrillas de  $\beta$ -amiloide 40 que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En

5 algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-fibrillas de  $\beta$ -amiloide 40 de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítipo de fibrillas de  $\beta$ -amiloide 40 que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-fibrillas de  $\beta$ -amiloide 40 de alto título se enriquece para un anticuerpo anti-fibrillas de  $\beta$ -amiloide 40 en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti-fibrillas de  $\beta$ -amiloide 40 en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

10 En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-RAGE preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-RAGE es una inmunoglobulina G agrupada anti-RAGE de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti-RAGE de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítipo de RAGE que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-RAGE de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítipo de RAGE que una composición de IgG total preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-RAGE de alto título se enriquece para un anticuerpo anti-RAGE en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti-RAGE en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

25 En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti- $\alpha$ -sinucleína preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti- $\alpha$ -sinucleína es una inmunoglobulina G agrupada anti- $\alpha$ -sinucleína de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\alpha$ -sinucleína de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítipo de  $\alpha$ -sinucleína que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\alpha$ -sinucleína de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítipo de  $\alpha$ -sinucleína que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti- $\alpha$ -sinucleína de alto título se enriquece para un anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti- $\alpha$ -sinucleína en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

40 En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-*Haemophilus influenzae* tipo B (Hib) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-Hib es una inmunoglobulina G agrupada anti-Hib de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti-Hib de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítipo de *Haemophilus influenzae* tipo B que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-Hib de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítipo de *Haemophilus influenzae* tipo B que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-Hib de alto título se enriquece para un anticuerpo anti-Hib en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti-Hib en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

55 En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-virus de la hepatitis B (Hbs) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-Hbs es una inmunoglobulina G agrupada anti-Hbs de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti-Hbs de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítipo del virus de la hepatitis B (por ejemplo, un epítipo del antígeno de superficie de hepatitis B) que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-Hbs de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un

epítopo de hepatitis B (por ejemplo, un epítopo de antígeno de superficie de hepatitis B) que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-Hbs de alto título se enriquece para un anticuerpo anti-Hbs en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti-Hbs en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-poliovirus tipo 1 Mahoney (anti-PV1) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-PV1 es una inmunoglobulina G agrupada anti-PV1 de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti-PV1 de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítopo de poliovirus que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-PV1 de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítopo de poliovirus que una composición de IgG total preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-PV1 de alto título se enriquece para un anticuerpo anti-PV1 en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti-PV1 en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-virus de la hepatitis A (VHA) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-VHA es una inmunoglobulina G agrupada anti-VHA de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti-VHA de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítopo del virus de la hepatitis A que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-VHA de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítopo del virus de la hepatitis A que una composición de IgG total preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-VHA de alto título se enriquece para un anticuerpo anti-VHA en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti-VHA en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-citomegalovirus (anti-CMV) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-CMV es una inmunoglobulina G agrupada anti-CMV de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti-CMV de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítopo de citomegalovirus que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-CMV de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítopo de citomegalovirus que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-CMV de alto título se enriquece para un anticuerpo anti-CMV en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti-CMV en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG antitetánicas preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG antitetánicas es una inmunoglobulina G agrupada antitetánica de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada antitetánica de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítopo de tétanos que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada antitetánica de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítopo de tétanos que una composición de IgG total preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada antitetánica de alto título se enriquece para un anticuerpo antitetánico en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo antitetánico en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG anti-parvovirus B19 preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG anti-parvo B19 es una inmunoglobulina G agrupada anti-parvo B19 de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada anti-parvo de alto título B19 contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítipo de parvovirus B19 que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-parvo B19 de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítipo de parvovirus B19 que una composición de IgG total preparada agrupada de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada anti-parvo B19 de alto título se enriquece para un anticuerpo anti-parvo B19 en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti-parvo B19 en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG enriquecidas en inmunoglobulinas IgG contra *Corynebacterium diphtheriae* (antidiftéricas) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas IgG antidiftéricas es una inmunoglobulina G agrupada antidiftérica de alto título. En una realización, la composición de inmunoglobulina G agrupada antidiftérica de alto título contiene una actividad de unión al menos 2 veces mayor para al menos un epítipo de *Corynebacterium diphtheriae* que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, una composición de inmunoglobulina G agrupada antidiftérica de alto título contiene al menos 3 veces, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítipo de *Corynebacterium diphtheriae* que una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la actividad de unión de una composición de inmunoglobulina G agrupada antidiftérica de alto título se enriquece para un anticuerpo antidiftérico en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo antidiftérico en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

#### A. Composiciones de IgG derivadas de plasma complementadas

En algunas realizaciones, las composiciones enriquecidas proporcionadas en el presente documento pueden usarse para complementar las composiciones de IgG derivadas de plasma tradicionales para lograr un título aumentado para una inmunoglobulina anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral específica. En determinadas realizaciones, una composición de IgG derivadas de plasma total (por ejemplo, una que no está enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral) se complementa con las composiciones enriquecidas descritas en el presente documento para lograr un título final de inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral que es aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces o más veces mayor de lo que se encontraría normalmente en la composición. Por tanto, se contempla que pueda administrarse menos cantidad de la composición de IgG derivadas de plasma complementada para el tratamiento de un síntoma de la enfermedad cerebral relacionada.

Por ejemplo, puede administrarse una composición de IGIV que se complementa con 8 veces más de inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, preparada mediante la adición de aproximadamente 1 volumen de una composición de IgG enriquecida 80 veces a 10 volúmenes de la IGIV normal) para el tratamiento de un síntoma de la enfermedad cerebral a una dosificación tan sólo de 25 mg/kg a 50 mg/kg, reduciendo en gran medida la demanda de IgG para la terapia de un síntoma de enfermedades cerebrales.

En algunas realizaciones, se proporcionan composiciones de IgG que se complementan con un título de aproximadamente 2 veces mayor a aproximadamente 50 veces mayor de una o más inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral. En algunas realizaciones, la composición complementada tenía un título de aproximadamente 2 veces mayor a aproximadamente 25 veces mayor, un título de aproximadamente 2 veces mayor a aproximadamente 20 veces mayor, un título de aproximadamente 2 veces mayor a aproximadamente 15 veces mayor, un título de aproximadamente 2 veces mayor a aproximadamente 10 veces mayor, un título de aproximadamente 2 veces mayor a aproximadamente 5 veces mayor de una o más inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral.

Ventajosamente, dado que puede determinarse el título de una inmunoglobulina anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral específica (por ejemplo, mediante ELISA u otro método adecuado conocido en la técnica), una composición de IgG no enriquecida puede complementarse con cualquier concentración de la inmunoglobulina anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral deseada. De esta manera, pueden adaptarse productos terapéuticos para incluir un título específico de una o más inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral.

#### V. Tratamiento de enfermedades y trastornos cerebrales.

En un aspecto, se proporcionan métodos para tratar una enfermedad cerebral en un sujeto que lo necesita mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) preparada según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la enfermedad cerebral es una enfermedad o un trastorno asociado con la expresión errónea (por ejemplo, sobreexpresión o subexpresión) de una proteína en el cerebro, una proteína mutada expresada de manera normal o anómala en el cerebro, una proteína que se ubica de manera anómala en el cerebro (por ejemplo, se ubica erróneamente o se ubica en exceso como en la deposición de placas de proteína en la corteza cerebral). En algunas realizaciones, la enfermedad o el trastorno cerebral está asociado con una proteína seleccionada del grupo que consiste en beta-amiloide (A $\beta$ ), alfa-sinucleína (SNCA), proteína priónica principal (PrP), huntingtina (HD), prolactina (PRL), cistatina C (CST3) y receptor específico de productos finales de glicosilación avanzada (RAGE). La tabla 1 proporciona ejemplos no limitativos de proteínas relacionadas con enfermedad cerebral y su enfermedad cerebral correspondiente.

En algunas realizaciones, se administra al sujeto una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulina IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral, en la que la proteína relacionada con enfermedad cerebral se selecciona del grupo que consiste en beta-amiloide (A $\beta$ ), alfa-sinucleína (SNCA), proteína priónica principal (PrP), huntingtina (HD), prolactina (PRL), cistatina C (CST3) y receptor específico de productos finales de glicosilación avanzada (RAGE). En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en más de un tipo de inmunoglobulina IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la composición de IgG está enriquecida en dos o más de inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE e inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína.

En los ensayos actuales que investigan el efecto terapéutico de la administración de IGIV sobre enfermedades cerebrales, los sujetos reciben entre 0,4 g/kg de peso corporal y 2,0 g/kg de peso corporal de IGIV por dosificación. En algunas realizaciones, los títulos aumentados de la IgG anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral en las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden reducir la cantidad de IgG administrada a estos pacientes, por ejemplo, hasta 100 veces.

En algunas realizaciones, se administra una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) que puede obtenerse mediante o preparada según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, para la terapia de una enfermedad o un trastorno cerebral a una dosificación de desde aproximadamente 0,25 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 1,0 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de aproximadamente 12,5 mg/kg, 15 mg/kg, 17,5 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg, o mayor.

En otras realizaciones, las composiciones enriquecidas proporcionadas en el presente documento pueden usarse para complementar las composiciones de IgG derivadas de plasma tradicionales para lograr un título aumentado para una inmunoglobulina anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral específica. En determinadas realizaciones, una composición de IgG derivadas de plasma total (por ejemplo, una que no está enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral) se complementa con las composiciones enriquecidas descritas en el presente documento para lograr un título final de inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral que es aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces o más veces mayor de lo que se encontraría normalmente en la composición. Por tanto, se contempla que pueda administrarse menos cantidad de la composición de IgG derivadas de plasma complementada para el tratamiento de un síntoma de la enfermedad cerebral relacionada.

Por ejemplo, puede administrarse una composición de IGIV que se complementa con 8 veces más de inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, preparada mediante la adición de aproximadamente 1 volumen de una composición de IgG enriquecida 80 veces a 10 volúmenes de la IGIV normal)

para el tratamiento de un síntoma de la enfermedad cerebral a una dosificación tan sólo de 25 mg/kg a 50 mg/kg, reduciendo en gran medida la demanda de IgG para la terapia de un síntoma de enfermedades cerebrales.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, se administra una composición de IgG complementada para la terapia de un síntoma de una enfermedad cerebral a una dosificación de desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 10,0 mg/kg hasta aproximadamente 150 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 150 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de aproximadamente 12,5 ± 10 mg/kg, 15 ± 10 mg/kg, 17,5 ± 10 mg/kg, 20 ± 10 mg/kg, 25 ± 10 mg/kg, 30 ± 10 mg/kg, 35 ± 10 mg/kg, 40 ± 10 mg/kg, 45 ± 10 mg/kg, 50 ± 10 mg/kg, 60 ± 10 mg/kg, 70 ± 10 mg/kg, 80 ± 10 mg/kg, 90 ± 10 mg/kg, 100 ± 10 mg/kg, 125 ± 10 mg/kg, 150 ± 10 mg/kg, 175 ± 10 mg/kg, 200 ± 10 mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg, o mayor.

#### 20 A. Enfermedad de Alzheimer

La IGIV se ha usado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Se ha propuesto que la IGIV contiene anticuerpos contra β-amiloide. Relkin *et al.* 2009 (Neurobiol. Aging 30(11): 1728-36). En este estudio, se administró IgG humana agrupada por vía intravenosa (terapia con IGIV) a ocho sujetos a los que se les diagnosticó enfermedad de Alzheimer (EA) leve. Los pacientes recibieron terapia con IGIV durante 6 meses, interrumpieron el tratamiento y luego reanudaron el tratamiento durante 9 meses más. Se halló que los anticuerpos contra β-amiloide en el suero de pacientes con EA aumentaron en proporción a la dosis de IGIV y los niveles plasmáticos de β-amiloide aumentaron transitoriamente después de cada infusión. Después de 6 meses de tratamiento, se realizaron minipuebas de estado mental en los pacientes. Las puntuaciones de minipuebas de estado mental aumentaron un promedio de 2,5 puntos después de 6 meses, volvieron al nivel inicial durante el periodo de lavado y se mantuvieron estables durante el tratamiento con IGIV posterior.

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para el tratamiento de un síntoma de la enfermedad de Alzheimer en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-Aβ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti-α-sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) que puede obtenerse mediante o preparada según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

En una realización específica, el método incluye la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-Aβ) que puede obtenerse mediante o preparada según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición contiene al menos 2 veces, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un confórmero de β-amiloide que una composición de IgG total preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la composición enriquecida para un anticuerpo anti-β-amiloide en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti-β-amiloide en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

En otra realización específica, el método incluye la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-RAGE que puede obtenerse mediante o preparada según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición contiene al menos 2 veces, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítipo de una proteína RAGE que una composición de IgG total preparada a partir de la sangre/plasma de más que mil individuos al azar. En algunas realizaciones, la composición enriquecida para un anticuerpo anti-RAGE en comparación con la concentración y/o actividad del anticuerpo anti-RAGE en una composición de IgG derivadas de plasma comercial.

La dosificación intravenosa típica de IgG en ensayos de Alzheimer en humanos oscila desde aproximadamente 200 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg cada dos semanas. Si se aprobase el tratamiento a estas dosificaciones para la terapia de los síntomas de Alzheimer, es poco probable que el suministro mundial de IgG derivadas del plasma, que ya está regulado para los tratamientos aprobados actualmente en algunos países, pueda satisfacer la demanda aumentada. Sin embargo, los métodos descritos en el presente documento proporcionan un

nuevo suministro de inmunoglobulinas derivadas de plasma altamente enriquecidas en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con Alzheimer (por ejemplo, inmunoglobulina IgG anti-A $\beta$  e inmunoglobulina IgG anti-RAGE), que no afecta al proceso de fabricación ni al rendimiento de los productos de IgG fabricados actualmente (por ejemplo, IGIV). Ventajosamente, puede ser posible administrar estas composiciones de IgG enriquecidas en

5 inmunoglobulinas anti-A $\beta$  e inmunoglobulinas anti-RAGE a menores dosificaciones debido a su alto contenido de inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con Alzheimer.

Por ejemplo, se muestra en el ejemplo 9 que pueden prepararse composiciones de IgG que tienen títulos de inmunoglobulina anti-RAGE 20 veces mayores y títulos de inmunoglobulina anti-A $\beta$  80 veces mayores a gran escala según los métodos descritos en el presente documento. Por tanto, puede ser posible administrar una terapia eficaz para los síntomas de la enfermedad de Alzheimer usando estas composiciones a dosificaciones de 20 a 80 veces menores (por ejemplo, a dosificaciones tan sólo de 2,5 mg/kg a 5,0 mg/kg).

10

Por consiguiente, en algunas realizaciones, se administra una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) que puede obtenerse mediante o preparada según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, para la terapia de un síntoma de la enfermedad de Alzheimer a una dosificación de desde aproximadamente 0,25 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 1,0 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de aproximadamente 12,5  $\pm$  10 mg/kg, 15  $\pm$  10 mg/kg, 17,5  $\pm$  10 mg/kg, 20  $\pm$  10 mg/kg, 25  $\pm$  10 mg/kg, 30  $\pm$  10 mg/kg, 35  $\pm$  10 mg/kg, 40  $\pm$  10 mg/kg, 45  $\pm$  10 mg/kg, 50  $\pm$  10 mg/kg, 60  $\pm$  10 mg/kg, 70  $\pm$  10 mg/kg, 80  $\pm$  10 mg/kg, 90  $\pm$  10 mg/kg, 100  $\pm$  10 mg/kg, 125  $\pm$  10 mg/kg, 150  $\pm$  10 mg/kg, 175  $\pm$  10 mg/kg, 200  $\pm$  10 mg/kg, 225  $\pm$  10 mg/kg, 250  $\pm$  10 mg/kg, 275  $\pm$  10 mg/kg, 300  $\pm$  10 mg/kg, 325  $\pm$  10 mg/kg, 350  $\pm$  10 mg/kg, 375  $\pm$  10 mg/kg, 400  $\pm$  10 mg/kg, o mayor.

15

20

25

30

En otras realizaciones, las composiciones enriquecidas proporcionadas en el presente documento pueden usarse para complementar las composiciones de IgG derivadas de plasma tradicionales para lograr un título aumentado para una inmunoglobulina anti-proteína relacionada con Alzheimer específica. En determinadas realizaciones, una composición de IgG derivadas de plasma total (por ejemplo, una que no está enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral) se complementa con las composiciones enriquecidas descritas en el presente documento para lograr un título final de inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral que es aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces o más veces mayor de lo que se encontraría normalmente en la composición. Por tanto, se contempla que pueda administrarse menos cantidad de la composición de IgG derivadas de plasma complementada para el tratamiento de un síntoma de la enfermedad de Alzheimer.

35

40

Por ejemplo, puede administrarse una composición de IGIV que se complementa con 8 veces más de inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-A $\beta$ ) y/o anti-RAGE (por ejemplo, preparada mediante la adición de aproximadamente 1 volumen de una composición de IgG enriquecida 80 veces a 10 volúmenes de la IGIV normal) para el tratamiento de un síntoma de la enfermedad de Alzheimer a una dosificación tan sólo de 25 mg/kg a 50 mg/kg, lo que reduce en gran medida la demanda de IgG para la terapia de un síntoma de la enfermedad de Alzheimer.

45

50

Por consiguiente, en algunas realizaciones, se administra una composición de IgG complementada para la terapia de un síntoma de la enfermedad de Alzheimer a una dosificación de desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 10,0 mg/kg hasta aproximadamente 150 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 150 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de aproximadamente 12,5  $\pm$  10 mg/kg, 15  $\pm$  10 mg/kg, 17,5  $\pm$  10 mg/kg, 20  $\pm$  10 mg/kg, 25  $\pm$  10 mg/kg, 30  $\pm$  10 mg/kg, 35  $\pm$  10 mg/kg, 40  $\pm$  10 mg/kg, 45  $\pm$  10 mg/kg, 50  $\pm$  10 mg/kg, 60  $\pm$  10 mg/kg, 70  $\pm$  10 mg/kg, 80  $\pm$  10 mg/kg, 90  $\pm$  10 mg/kg, 100  $\pm$  10 mg/kg, 125  $\pm$

55

60

65

10 mg/kg, 150 ± 10 mg/kg, 175 ± 10 mg/kg, 200 ± 10 mg/kg, o mayor.

B. Enfermedad de Parkinson

5 La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno degenerativo del SNC. La EP está vinculada en particular a una  
 10 disminución del control motor. La pérdida del control motor provocada por la EP resulta de la muerte de las células  
 generadoras de dopamina en la sustancia negra, una región del mesencéfalo. Al principio de la progresión de la  
 enfermedad, los síntomas más comunes incluyen temblores, rigidez, lentitud de movimiento y dificultad para caminar  
 y en la marcha. A medida que la enfermedad progresa, surgen problemas cognitivos y conductuales, produciéndose  
 15 demencia en los estadios avanzados de la enfermedad. Los síntomas adicionales incluyen problemas sensitivos, del  
 sueño y emocionales. La EP es más común en los ancianos, produciéndose síntomas con la mayor frecuencia  
 después de los 50 años.

15 Existen numerosos modelos de ratones transgénicos para la EP. Estos modelos incluyen, por ejemplo, cepas  
 transgénicas Park2 (parkina), cepas transgénicas LRRK2 y cepas transgénicas de sinucleína (Jackson Laboratories,  
 Bar Harbor, Maine). Además de los modelos transgénicos, los síntomas parkinsonianos también pueden inducirse  
 en ratones mediante la administración de los compuestos MPTP, rotenona, paraquat o maneb.

20 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para el tratamiento de un síntoma de la enfermedad de  
 Parkinson en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz  
 de una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral (por  
 ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-Aβ), inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti-α-  
 sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral) que puede  
 25 obtenerse mediante o preparada según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

25 En una realización específica, el método incluye la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz  
 de una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-α-sinucleína que puede obtenerse mediante o  
 preparada según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la  
 composición contiene al menos 2 veces, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,  
 30 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160,  
 170, 180, 190, 200 veces o más de la actividad de unión para al menos un epítipo de una proteína α-sinucleína que  
 una composición de IgG total agrupada preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar. En  
 algunas realizaciones, la composición enriquecida para un anticuerpo anti-α-sinucleína en comparación con la  
 concentración y/o actividad del anticuerpo anti-α-sinucleína en una composición de IgG derivadas de plasma  
 35 comercial.

35 En algunas realizaciones, se administra una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-proteína  
 relacionada con enfermedad cerebral (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (anti-Aβ), inmunoglobulinas  
 anti-RAGE, inmunoglobulinas anti-α-sinucleína, u otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada  
 40 con enfermedad cerebral) que puede obtenerse mediante o preparada según cualquiera de los métodos descritos en  
 el presente documento, para la terapia de un síntoma de la enfermedad de Parkinson a una dosificación de desde  
 aproximadamente 0,25 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG  
 enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 1,0 mg/kg hasta aproximadamente  
 45 200 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde  
 aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG  
 enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente  
 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde  
 50 aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG  
 enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente  
 20 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de  
 aproximadamente 12,5 mg/kg, 15 mg/kg, 17,5 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg,  
 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg,  
 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg, o mayor.

55 En otras realizaciones, las composiciones enriquecidas proporcionadas en el presente documento pueden usarse  
 para complementar las composiciones de IgG derivadas de plasma tradicionales para lograr un título aumentado  
 para una inmunoglobulina anti-proteína relacionada con Parkinson específica. En determinadas realizaciones, una  
 composición de IgG derivadas de plasma total (por ejemplo, una que no está enriquecida en inmunoglobulinas anti-  
 60 proteína relacionada con enfermedad cerebral) se complementa con las composiciones enriquecidas descritas en el  
 presente documento para lograr un título final de inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad  
 cerebral que es aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces,  
 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50  
 veces o más veces mayor de lo que se encontraría normalmente en la composición. Por tanto, se contempla que  
 pueda administrarse menos cantidad de la composición de IgG derivadas de plasma complementada para el  
 65 tratamiento de un síntoma de la enfermedad de Alzheimer.

Por ejemplo, puede administrarse una composición de IGIV que se complementa con 8 veces más de inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína (SNCA) (por ejemplo, preparada mediante la adición de aproximadamente 1 volumen de una composición de IgG enriquecida 80 veces a 10 volúmenes de la IGIV normal) para el tratamiento de un síntoma de la enfermedad de Parkinson a una dosificación tan sólo de 25 mg/kg a 50 mg/kg, reduciendo en gran medida la demanda de IgG para la terapia de un síntoma de la enfermedad de Parkinson.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, se administra una composición de IgG complementada para la terapia de un síntoma de la enfermedad de Parkinson a una dosificación de desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 10,0 mg/kg hasta aproximadamente 150 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 150 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de aproximadamente  $12,5 \pm 10$  mg/kg,  $15 \pm 10$  mg/kg,  $17,5 \pm 10$  mg/kg,  $20 \pm 10$  mg/kg,  $25 \pm 10$  mg/kg,  $30 \pm 10$  mg/kg,  $35 \pm 10$  mg/kg,  $40 \pm 10$  mg/kg,  $45 \pm 10$  mg/kg,  $50 \pm 10$  mg/kg,  $60 \pm 10$  mg/kg,  $70 \pm 10$  mg/kg,  $80 \pm 10$  mg/kg,  $90 \pm 10$  mg/kg,  $100 \pm 10$  mg/kg,  $125 \pm 10$  mg/kg,  $150 \pm 10$  mg/kg,  $175 \pm 10$  mg/kg,  $200 \pm 10$  mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg, o mayor.

#### VI. Tratamiento de enfermedades infecciosas

En un aspecto, se proporcionan métodos para tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto que lo necesita mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-Hib, inmunoglobulinas anti-Hbs, inmunoglobulinas anti-PV1, inmunoglobulinas anti-VHA, inmunoglobulinas anti-CMV, inmunoglobulinas antitetánicas, inmunoglobulinas anti-parvo B19 o inmunoglobulinas antidiftéricas) preparadas según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, al sujeto se le administra una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulina IgG anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa, en la que el agente de enfermedad infecciosa se selecciona del grupo que consiste en *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis A (VHA), poliovirus (PV), citomegalovirus (CMV), *Clostridium tetani* (tétanos), parvovirus B19 o *Corynebacterium diphtheriae* (difteria). En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida en más de un tipo de inmunoglobulina IgG anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa. En algunas realizaciones, los títulos aumentados de la IgG anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa en las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden reducir la cantidad de IgG administrada a pacientes, por ejemplo, hasta 100 veces.

En algunas realizaciones, se administra una composición de IgG enriquecida en inmunoglobulinas anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa (por ejemplo, inmunoglobulinas anti-Hib, inmunoglobulinas anti-Hbs, inmunoglobulinas anti-PV1, inmunoglobulinas anti-VHA, inmunoglobulinas anti-CMV, inmunoglobulinas antitetánicas, inmunoglobulinas anti-parvo B19 o inmunoglobulinas antidiftéricas) que puede obtenerse mediante o preparada según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, para la terapia de una enfermedad infecciosa a una dosificación de desde aproximadamente 0,25 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 1,0 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 2,5 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de aproximadamente 12,5 mg/kg, 15 mg/kg, 17,5 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg, o mayor.

En otras realizaciones, las composiciones enriquecidas proporcionadas en el presente documento pueden usarse para complementar las composiciones de IgG derivadas de plasma tradicionales para lograr un título aumentado para una inmunoglobulina anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa específica. En determinadas realizaciones, una composición de IgG derivadas de plasma total (por ejemplo, una que no está enriquecida en inmunoglobulinas anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa) se complementa con una composición

enriquecida descrita en el presente documento para lograr un título final de inmunoglobulinas anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa que es aproximadamente 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, 11 veces, 12 veces, 13 veces, 14 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 35 veces, 40 veces, 45 veces, 50 veces o más veces mayor de lo que se encontraría normalmente en la composición. Por tanto, se contempla que pueda administrarse menos cantidad de la composición de IgG derivadas de plasma complementada para el tratamiento de un síntoma de la enfermedad infecciosa relacionada.

Por ejemplo, puede administrarse una composición de IGIV que se complementa con 8 veces más de inmunoglobulinas anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa (por ejemplo, preparada mediante la adición de aproximadamente 1 volumen de una composición de IgG enriquecida 80 veces a 10 volúmenes de la IGIV normal) para el tratamiento de un síntoma de la enfermedad infecciosa a una dosificación tan sólo de 25 mg/kg a 50 mg/kg, reduciendo en gran medida la demanda de IgG para la terapia de un síntoma de enfermedades infecciosas.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, se administra una composición de IgG complementada para la terapia de un síntoma de una enfermedad infecciosa a una dosificación de desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 400 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 10,0 mg/kg hasta aproximadamente 150 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 10 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 150 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de desde aproximadamente 25 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg. En algunas realizaciones, la composición de IgG enriquecida se administra a una dosificación de aproximadamente 12,5 ± 10 mg/kg, 15 ± 10 mg/kg, 17,5 ± 10 mg/kg, 20 ± 10 mg/kg, 25 ± 10 mg/kg, 30 ± 10 mg/kg, 35 ± 10 mg/kg, 40 ± 10 mg/kg, 45 ± 10 mg/kg, 50 ± 10 mg/kg, 60 ± 10 mg/kg, 70 ± 10 mg/kg, 80 ± 10 mg/kg, 90 ± 10 mg/kg, 100 ± 10 mg/kg, 125 ± 10 mg/kg, 150 ± 10 mg/kg, 175 ± 10 mg/kg, 200 ± 10 mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg, o mayor.

## VII. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir esencialmente resultados iguales o similares.

### *Ejemplo 1 - Identificación de inmunoglobulinas relacionadas con enfermedad cerebral en la fracción de lavado con alto contenido de sal formada durante la regeneración cromatográfica*

Para identificar un método para preparar una composición de inmunoglobulina G agrupada enriquecida en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide (A $\beta$ ), se usó plasma humano agrupado que contenía un alto título de inmunoglobulinas anti-A $\beta$  como material de partida para la preparación de una composición de IgG derivadas de plasma. Se fraccionó el plasma humano agrupado con etanol según las condiciones habituales y luego se enriqueció adicionalmente la IgG en la fracción plasmática resultante mediante cromatografía, tal como se describe en la figura 1. Sin embargo, el análisis del producto final reveló que, a diferencia de la agrupación de plasma inicial, la composición de inmunoglobulina G humana agrupada no se enriqueció en inmunoglobulinas anti-A $\beta$ .

Debido a que la composición final no contenía el alto título esperado de inmunoglobulinas anti-A $\beta$ , se contempló que estas inmunoglobulinas estaban separándose parcialmente en una etapa del proceso de purificación que da como resultado una pérdida de rendimiento. Una de estas etapas candidatas es la etapa 110 de cromatografía de intercambio catiónico, que da como resultado una pérdida de menos del 5% del contenido de inmunoglobulina G total de la agrupación de plasmas de Cohn inicial. Se consideró posible que el tampón usado para eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico en la etapa 110 cromatográfica no tenga suficiente fuerza iónica (5,0 ± 0,2 mS/cm) a pH 8,5 para eluir esta fracción de IgG. Así, se investigó la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M, generada durante la regeneración de la resina de intercambio catiónico. También se investigó el contenido de IgG global y el patrón de sialilación en la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M.

Los resultados de estos análisis, descritos con detalle a continuación, demuestran que, en comparación con la fracción de IgG principal recuperada en la primera fracción de eluato de intercambio catiónico, la fracción de lavado 2 M: (i) tenía una distribución de subclases de IgG diferente, incluyendo niveles aumentados de IgG<sub>3</sub>; (ii) contenía mayores actividades de unión específicas contra todos los confórmers de A $\beta$  inmovilizados en placa investigados, lo que indica una mayor concentración relativa de inmunoglobulinas anti-A $\beta$ ; y (iii) contenía niveles relativos aumentados de N-glicanos de IgG<sub>1</sub> monosialilados. El perfil de distribución del tamaño molecular de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M reveló mayores niveles de dímeros y polímeros de inmunoglobulina, lo que se explica al menos parcialmente por la mayor concentración relativa de IgM en la fracción de lavado. Los datos

presentados a continuación proporcionan una evidencia exhaustiva de que la IgG contenida en esta fracción de desecho tiene una mayor unión a todos los confórmers de A $\beta$  y mayores niveles promedio de glicanos de Fc sialilados que la IgG de la fracción de eluato de intercambio catiónico principal.

5 **Ejemplo 2 - Análisis mediante ELISA de la unión a beta-amiloide en las fracciones de eluato y de lavado con alto contenido de sal formadas durante la cromatografía de intercambio catiónico**

10 Se usaron muestras congeladas de ocho eluatos de intercambio catiónico y las fracciones de lavado a 2 M correspondientes formadas durante la preparación a gran escala de una composición de IgG derivadas de plasma para los análisis que se describen a continuación. Antes del análisis, se descongelaron las muestras, se dividieron en alícuotas y volvieron a congelarse para garantizar que la integridad del material usado para cada análisis fuera la misma.

15 Se disolvió el péptido  $\beta$ -amiloide humano (1-42) (A $\beta$ 42) (Calbiochem; PP69 o American Peptide; 62-0-80) para el recubrimiento sin tratamiento adicional en ácido trifluoroacético (250  $\mu$ g/25  $\mu$ l de TFA o ácido fórmico). Se obtuvieron preparaciones de  $\beta$ -amiloide de orden superior, por ejemplo, especies de proteína  $\beta$ -amiloide reticuladas solubles (CAPS) y las fibrillas de A $\beta$  de Brian O’Nuallain (Universidad de Knoxville, TN) y se prepararon tal como se publicó (O’Nuallain B. *et al.*, *Biochemistry* 47, 12254-12256 (2008), que se refiere a la generación de preparaciones de  $\beta$ -amiloide de orden superior). Los tampones usados en el posterior análisis mediante ELISA de la unión a A $\beta$  se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Tampones usados para análisis mediante ELISA de anticuerpos anti-A $\beta$ .

Tampón	Formulación
Tampón de recubrimiento	NaHCO <sub>3</sub> 0,1 M, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,1 M; disuelto en agua de calidad para HPLC; pH 9,5 con HCl 3 M
Tampón de lavado (PBST)	NaCl al 0,8%, KCl al 0,02%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> al 0,02%, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O al 0,126%, Tween 20 al 0,05%, pH 7,0-7,4
Tampón de bloqueo/dilución “gelatina”	gelatina al 0,1%, benzamidina 2 mM en PBST
Tampón de bloqueo/dilución “leche”	leche desnatada en polvo al 0,1%, benzamidina 2 mM en PBST
Tampón de bloqueo/dilución “hSA”	hSA al 1%, benzamidina 2 mM en PBST
Tampón de bloqueo/dilución “BSA”	BSA al 0,1%, benzamidina 2 mM en PBST
Tampón de dilución de baja conductividad	HEPES 20 mM, pH 7,4; hSA al 1%, benzamidina 2 mM, Tween 20 al 0,1%
Disolución de detención	1,5 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

25 Se midieron los niveles de IgG anti-A $\beta$  usando ELISA directo con el antígeno de prueba recubierto directamente en la placa y restando la unión de las diluciones de las muestras a los pocillos de blanco tal como se describe (New Trends in Alzheimer and Parkinson Related Disorders: ADPD2009, Collection of Selected free Papers from the 9th International Conference on Alzheimer’s and Parkinson’s Disease AD/PD, editado por Abraham Fisher & Israel Hanin; y Szabo P. *et al.*, (2010): *J Neuroimmunology*; doi 10.1016/j.jneuroim.2010.06.010, que se refieren a procedimientos de ELISA). En particular, se usaron monómeros de A $\beta$ 42, CAPS de A $\beta$ 40 y fibrillas de A $\beta$ 40 para recubrir las placas de ELISA. Se realizaron ELISA en ambas condiciones isotónicas usando PBS y a una menor conductividad en tampón HEPES 20 mM, pH 7,2. Se diluyó el monómero de A $\beta$ 42 de antígeno de recubrimiento hasta 10  $\mu$ g/ml con tampón de recubrimiento filtrado a través de filtro de 0,2  $\mu$ m, mientras que las CAPS y las fibrillas se diluyeron hasta 2  $\mu$ g/ml. Se cargaron 100  $\mu$ l/pocillo de la disolución de recubrimiento en la mitad superior (filas A - D) de la microplaca de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp F96) usando puntas estériles. La mitad inferior de la placa (filas E - H) se cargó con 100  $\mu$ l/pocillo de tampón de recubrimiento. Luego se selló la placa y se incubó a 4°C durante la noche. Se usó PBST como tampón de lavado. El lavado terminó el procedimiento de recubrimiento y se realizó adicionalmente entre las etapas individuales. Las placas lavadas se incubaron con 200  $\mu$ l/pocillo de tampón de bloqueo/dilución filtrado a través de filtro de 0,2  $\mu$ m “hSA” a 37°C durante 1 hora y luego se lavaron. Se preparó luego la serie de dilución de muestra, que consiste en seis diluciones 1 + 1, en la placa (100  $\mu$ l/pocillo) y se incubó durante 1 h a TA. La serie de dilución comenzó a diluciones aproximadamente 100 veces mayores para el sistema HEPES, teniendo en cuenta las mayores señales obtenidas con una menor conductividad. Después del lavado, se añadieron a la placa lavada 100  $\mu$ l/pocillo de anticuerpo anti-IgG humana-peroxidasa (DakoCytomation, 1/2000 en tampón de bloqueo/dilución) y se incubaron a TA durante 1 hora, antes de un lavado adicional. Se midió la peroxidasa unida por medio de Sureblue (100  $\mu$ l/pocillo) y se detuvo la reacción de color después de 15 minutos a TA mediante la adición de 100  $\mu$ l/pocillo de ácido sulfúrico 1,5 M. Posteriormente se midió la unión a 450 nm con la longitud de onda de referencia establecida en 620 nm. La evaluación de los datos fue de la siguiente manera: se

5 corrigieron las densidades ópticas (DO) promediadas de los duplicados restando la DO media del blanco de reactivo respectivo. En la siguiente etapa, se corrigieron adicionalmente las DO medias obtenidas para una dilución particular de la muestra en los pocillos recubiertos con A $\beta$ 42 restando las DO medias respectivas medidas para la misma dilución en los pocillos de blanco. Las DO así obtenidas se usaron adicionalmente para establecer una curva de concentración-respuesta con las concentraciones de IgG de las diluciones. Los resultados finales de los ensayos se obtuvieron usando esta curva lineal de concentración-respuesta y se expresaron como DO por mg de IgG.

10 Se muestran los resultados del análisis mediante ELISA realizado en el sistema de tampón PBS para los ocho pares de muestras en la figura 2A. En particular, se facilitan las señales medias para fibrillas de A $\beta$ 40 y pocillos no recubiertos, medidos para la menor dilución de la serie de dilución, así como las razones entre estas señales y las DO por mg de IgG para normalizar las diferentes concentraciones de IgG de las muestras. Finalmente, la tabla proporciona las razones entre las señales normalizadas para IgG de las fracciones de lavado a 2 M y los eluatos de intercambio catiónico, que se muestran en la columna "Razón 2 M/E".

15 Tal como se notificó en la figura 2A, las fracciones de lavado a 2 M mostraron una mayor unión a las fibrillas de A $\beta$ 40 inmovilizadas en placa que los eluatos correspondientes en todos los casos, oscilando las razones desde 1,4 hasta 4,2, lo que da como resultado una razón media de 2,5. Curiosamente, la IgG contenida en la fracción de lavado 2 M demostró, en promedio, una unión casi dos veces mayor a los pocillos de blanco. En particular, las dos fracciones de lavado a 2 M con la mayor unión a los pocillos de blanco, LE12H254Z y LE12H256Z, también fueron las fracciones de lavado que mostraron el menor aumento de la unión a A $\beta$ , en comparación con las fracciones de eluato correspondientes. Esto sugiere que anticuerpos con diferentes especificidades son responsables de esta unión observada.

25 Se muestran los resultados del análisis mediante ELISA realizado en el sistema de fuerza iónica baja para los ocho pares de muestras en la figura 2B. De nuevo, en todos los casos, las fracciones de lavado a 2 M demostraron una mayor unión a las fibrillas de A $\beta$ 40 que los eluatos correspondientes, oscilando las razones desde 3,3 hasta 8,0, lo que da como resultado una razón media de 4,6. En general, las condiciones de fuerza iónica baja aumentaron la unión a los pocillos recubiertos con A $\beta$ , de tal manera que pudieron usarse menores concentraciones de IgG en los ensayos. Esto disminuyó la unión a los pocillos no recubiertos con A $\beta$  para ambas fracciones, que fue menor del 4% para ambas fracciones. Curiosamente, en estas condiciones, las IgG de la fracción de lavado 2 M mostraron una menor unión a los pocillos de blanco que las contenidas en el eluato. En general, los resultados obtenidos tanto en condiciones isotónica como de fuerza iónica baja demuestran que la fracción de lavado 2 M contiene mayores concentraciones relativas de anticuerpos específicos para fibrillas de A $\beta$ 40, que los eluatos de intercambio catiónico correspondientes (por ejemplo, las fracciones de lavado a 2 M están más enriquecidas para los anticuerpos anti-fibrillas de A $\beta$ 40). Curiosamente, esta diferencia es más pronunciada en las condiciones de fuerza iónica baja. Los datos de ELISA de fibrillas de A $\beta$ 40 se resumen en la figura 3, que compara directamente las DO normalizadas observadas para las fracciones de lavado a 2 M y los eluatos de intercambio catiónico.

40 Luego se investigó la unión de las fracciones de lavado a 2 M y los eluatos de intercambio catiónico correspondientes a CAPS de A $\beta$ 40. La figura 4 muestra los datos obtenidos de las mediciones de los ocho pares de muestras usando el sistema de tampón PBS. Específicamente, se facilitan las señales medias de los pocillos recubiertos con CAPS y de blanco, medidos para la menor dilución de la serie de dilución. También se notifican las razones entre estas señales y las DO por mg de IgG, que se normalizan para las concentraciones de IgG de las muestras. Finalmente, la tabla proporciona las razones entre las señales normalizadas para IgG de las fracciones de lavado a 2 M y los eluatos de intercambio catiónico correspondientes.

50 Tal como se notificó en la figura 4A, en condiciones de tampón isotónico, las fracciones de lavado a 2 M tenían una mayor unión a las CAPS de A $\beta$ 40 que los eluatos de intercambio catiónico correspondientes en todos los casos, oscilando las razones (2 M/E) desde 1,8 hasta 2,9, lo que da como resultado una razón media de 2,1. La fracción de lavado 2 M también presentó una mayor unión a los pocillos de blanco que los eluatos correspondientes.

55 Se muestran los resultados del análisis mediante ELISA realizado en el sistema de tampón de fuerza iónica baja para los ocho pares de muestras en la figura 4B. De nuevo, las fracciones de lavado a 2 M demostraron una mayor unión a las CAPS de A $\beta$ 40 que los eluatos correspondientes, oscilando las razones desde 1,8 hasta 4,4, lo que da como resultado una razón media de 3,1. En general, usando el sistema de tampón de baja conductividad, se mejoró la unión de IgG a las CAPS unidas a placa, mientras que se redujo la unión a los pocillos de blanco, lo que representa menos del 4% de la señal medida total cuando se realizó el ensayo a baja conductividad. Curiosamente, la diferencia en la unión a las CAPS de A $\beta$ 40 entre las fracciones de lavado a 2 M y eluato fue más pronunciada en condiciones de fuerza baja. En general, los resultados obtenidos tanto en condiciones isotónicas como de fuerza iónica baja demuestran que la fracción de lavado 2 M contiene mayores concentraciones relativas de anticuerpos específicos para CAPS de A $\beta$ 40, que los eluatos de intercambio catiónico correspondientes (por ejemplo, las fracciones de lavado a 2 M están más enriquecidas para los anticuerpos anti-CAPS de A $\beta$ 40). Tal como se observa para los ELISA de fibrillas de A $\beta$ 40, las señales generadas usando el sistema de tampón de fuerza iónica baja, usando diluciones 100 veces mayores, evidencian la mayor unión obtenida con el sistema de tampón de ELISA de fuerza iónica baja. Los datos de ELISA de CAPS de A $\beta$ 40 se resumen en la figura 5, que compara directamente las

DO normalizadas observadas para las fracciones de lavado a 2 M y los eluatos de intercambio catiónico.

Finalmente, se investigó la unión de las fracciones de lavado a 2 M y los eluatos de intercambio catiónico correspondientes a monómeros de A $\beta$ 42. La figura 6 presenta los datos obtenidos de los ensayos ELISA de los ocho pares de muestras usando los sistemas tampón de fuerza iónica baja y PBS. Específicamente, se facilitan las señales medias de los pocillos recubiertos con monómeros de A $\beta$ 42 y de blanco, medidos para la menor dilución de la serie de dilución. También se notifican las razones entre estas señales y las DO por mg de IgG, que se normalizan para las concentraciones de IgG de las muestras. Finalmente, la tabla proporciona las razones entre las señales normalizadas para IgG de las fracciones de lavado a 2 M y los eluatos de intercambio catiónico correspondientes.

Tal como se notifica en la figura 6A, en condiciones de tampón isotónico, las fracciones de lavado a 2 M tenían una mayor unión a los monómeros de A $\beta$ 42 que los eluatos de intercambio catiónico correspondientes, oscilando las razones (2 M/E) desde 0,9 hasta 3,0, lo que da como resultado una razón media de 1,7. La fracción de lavado 2 M también presentó una mayor unión a los pocillos de blanco que los eluatos correspondientes.

Se muestran los resultados del análisis mediante ELISA realizado en el sistema de tampón de fuerza iónica baja para los ocho pares de muestras en la figura 6B. De nuevo, las fracciones de lavado a 2 M demostraron una mayor unión a los monómeros de A $\beta$ 42 que los eluatos correspondientes, oscilando las razones desde 2,3 hasta 7,8, lo que da como resultado una razón media de 3,7. En general, usando el sistema de tampón de baja conductividad, se mejoró la unión de IgG a los monómeros de A $\beta$ 42 unidos a placa, mientras que se redujo la unión a los pocillos de blanco, lo que representa no más del 9% de la señal medida total cuando se realizó el ensayo a baja conductividad. De nuevo, la diferencia en la unión a los monómeros de A $\beta$ 42 entre las fracciones de lavado a 2 M y eluato fue más pronunciada en condiciones de fuerza baja. En general, los resultados obtenidos tanto en condiciones isotónicas como de fuerza iónica baja demuestran que la fracción de lavado 2 M contiene mayores concentraciones relativas de anticuerpos específicos para monómeros de A $\beta$ 42, que los eluatos de intercambio catiónico correspondientes (por ejemplo, las fracciones de lavado a 2 M están más enriquecidas para anticuerpos anti-monómeros de A $\beta$ 42). Tal como se observa para los ELISA de fibrillas y CAPS de A $\beta$ 40, las señales generadas usando el sistema de tampón de fuerza iónica baja, usando diluciones 100 veces mayores, evidencian la mayor unión obtenida con el sistema de tampón de ELISA de fuerza iónica baja. Los datos de ELISA de monómeros de A $\beta$ 42 se resumen en la figura 7, que compara directamente las DO normalizadas observadas para las fracciones de lavado a 2 M y los eluatos de intercambio catiónico.

La figura 8 resume todos los datos de ELISA recopilados para la unión de anticuerpos anti-A $\beta$  en las fracciones de lavado a 2 M y eluato de intercambio catiónico. Las fracciones de lavado a 2 M mostraron una mayor unión a todos los conformeros del péptido A $\beta$  sometidos a prueba que las fracciones de eluato, evidenciando mayores contenidos relativos de anticuerpos anti-A $\beta$  en la fracción de lavado. En promedio, en condiciones isotónicas, la fracción de lavado 2 M contenía una unión 1,7, 2,1 y 2,5 veces mayor a monómero de A $\beta$ 42, CAPS de A $\beta$ 40 y fibrillas de A $\beta$ 42, respectivamente, que el eluato correspondiente (figura 8A). Estos resultados estuvieron corroborados por los resultados obtenidos a baja conductividad (por ejemplo, condiciones subsotónicas), en los que la diferencia en la afinidad de unión fue más pronunciada. En condiciones subsotónicas, la fracción de lavado 2 M contenía una unión 3,7, 3,1 y 4,6 veces mayor a monómero de A $\beta$ 42, CAPS de A $\beta$ 40 y fibrillas de A $\beta$ 42, respectivamente, que el eluato correspondiente (figura 8B).

En resumen, los datos de ELISA demuestran que la fracción de lavado 2 M de la etapa de cromatografía de intercambio catiónico de CM contiene niveles enriquecidos de IgG anti-amiloideogénica, cuando se compara de manera directa con las fracciones de eluato correspondientes. El enriquecimiento de la unión a A $\beta$  en la fracción de lavado 2 M es aún más pronunciada cuando se usan condiciones de ensayo de fuerza iónica baja para los ELISA.

### *Ejemplo 3 - Análisis de subclases de IgG de anticuerpos en las fracciones de eluato y de lavado con alto contenido de sal formadas durante la cromatografía de intercambio catiónico*

Los mismos ocho pares de eluatos de intercambio catiónico y las fracciones de lavado a 2 M correspondientes formados durante la preparación a gran escala de una composición de IgG derivadas de plasma descrita en el ejemplo 2 se usaron en el análisis de subclases de IgG descrito a continuación.

La proporción de subclases de IgG en las fracciones de lavado a 2 M y de eluato se midió mediante ELISA frente a anticuerpos de captura y detección específicos de subclases de IgG humana (el sitio de unión). Se calibraron los ensayos según las concentraciones de subclases de IgG publicadas de la preparación de referencia internacional CRM470 (Schauer U. *et al.*, (2003): Clin Chem 49(11), 1924-1929). La figura 9A muestra los datos recopilados para cada uno de los ocho pares de muestras de eluatos y las fracciones de lavado a 2 M correspondientes. Estos datos se notifican como porcentaje de IgG total, que se determinó como la suma de las cuatro mediciones de subclases.

La distribución de subclases de la IgG en la fracción de lavado 2 M difirió notablemente de la determinada para la fracción de eluato, tal como se resume en la figura 9B. Lo más sorprendente es que las fracciones de lavado a 2 M tienen un contenido relativo de IgG<sub>3</sub> casi 6 veces mayor que las fracciones de eluato correspondientes. Por

consiguiente, se redujeron las concentraciones relativas de IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> en las fracciones de lavado a 2 M, mientras que la concentración relativa de IgG<sub>1</sub> fue la misma en las fracciones de lavado a 2 M y de eluato.

5 *Ejemplo 4 - Análisis del contenido de IgA e IgM en las fracciones de eluato y de lavado con alto contenido de sal formadas durante la cromatografía de intercambio catiónico*

Debido a que la cromatografía de intercambio catiónico de carboximetilo (CM) fue la primera etapa de enriquecimiento posterior usada para la preparación de la composición de IgG derivadas del plasma (expuesto de manera resumida en la figura 1), se especuló que las fracciones de lavado a 2 M y de eluato pueden tener diferentes concentraciones relativas de IgA e IgM. Para investigar esta posibilidad, se realizaron ensayos ELISA específicos para anticuerpos IgA e IgM humanos. La figura 10A notifica los resultados de estos ensayos, mostrando concentraciones de IgA e IgM en cada uno de los ocho pares de fracciones de eluato de intercambio catiónico y de lavado a 2 M descritas anteriormente. Las concentraciones se notifican como absolutas ( $\mu\text{g/ml}$ ) y normalizadas para la concentración de IgG correspondiente de la muestra ( $\mu\text{g}$  de IgA o IgM por mg de IgG). La diferencia en el contenido de IgA e IgM para cada muestra coincidente se ilustra en las figuras 10B y 10C, respectivamente.

Tal como se observa en la figura 10, las fracciones de eluato de intercambio catiónico y de lavado a 2 M tenían diferentes concentraciones de IgA e IgM. Curiosamente, las concentraciones relativas de IgA en las fracciones de eluato fueron, en promedio, 2,5 veces mayores que en las fracciones de lavado a 2 M correspondientes, mientras que se halló lo contrario para el contenido de IgM, en el que se encontró que era, en promedio, 2,9 veces mayor en las fracciones de lavado a 2 M que en los eluatos correspondientes. En términos absolutos, los eluatos contenían menores niveles de IgM que IgA, mientras que las fracciones de lavado a 2 M tenían niveles similares de ambos tipos de inmunoglobulinas. Estos datos ayudan a explicar las diferencias en los perfiles de distribución de tamaño molecular observados para las fracciones de eluato y de lavado a 2 M, que se notifican a continuación.

25 *Ejemplo 5 - Análisis mediante HP-SEC de los perfiles de peso molecular de las fracciones de eluato y de lavado con alto contenido de sal formadas durante la cromatografía de intercambio catiónico*

La HP-SEC realizada con columnas de sílice hidrófila es el método de elección establecido para el análisis del perfil de distribución del tamaño molecular de las composiciones de inmunoglobulina. En este caso, debe tenerse en cuenta que: (i) este análisis se realizó en fracciones intermedias, en lugar de un producto final; y (ii) el lavado a 2 M y las fracciones de lavado correspondientes diferían en sus concentraciones de IgA e IgM. Mientras que el primer punto a considerar explica los niveles relativos inusualmente altos de agregados, medidos para ambas fracciones, el segundo punto ayuda a explicar las diferencias con respecto a las concentraciones relativas de agregados observadas en ambas fracciones. La figura 11A ilustra las concentraciones relativas medias de los cuatro picos separados en HP-SEC para las fracciones de eluato y de lavado a 2 M. Los datos numéricos sin procesar son para cada muestra se notifican en la figura 11B.

Tal como se ilustra en la figura 11A, la concentración relativa media de agregados de las fracciones de lavado a 2 M fue 2 veces mayor que para las fracciones de eluato. Sin embargo, tal como puede observarse en la figura 11B, esta diferencia está provocada principalmente por tres lotes particulares (LE12H302Z, LE12H303Z y LE12H304Z) que tenían, cada uno, concentraciones relativas de agregados de más del 10%. Estos lotes también tenían las mayores concentraciones relativas de IgM, representando al menos una parte de los niveles elevados de agregación. La mayor concentración relativa de dímero observada en cada fracción de lavado a 2 M individual, en comparación con la fracción de eluato correspondiente, puede explicarse al menos en parte por las mayores concentraciones relativas de la subclase IgG<sub>3</sub> halladas en la fracción de lavado a 2 M, ya que este subtipo de IgG eluye más tarde en el análisis mediante SEC debido a su región bisagra alargada.

50 *Ejemplo 6 - Análisis de unión a lectina de IgG presente en fracciones de eluato y de lavado con alto contenido de sal formadas durante la cromatografía de intercambio catiónico*

Las lectinas son herramientas útiles para investigar hidratos de carbono complejos, ya que se unen con alta selectividad, reconociendo en la mayoría de los casos no sólo mono u oligosacáridos sino también enlaces. La SNA es un ejemplo para una lectina tan selectiva, ya que sólo se une estrictamente a ácido siálico cuando está presente en un enlace  $\alpha$ 2,6 a galactosa (Stadlmann J *et al.* (2009): Proteomics 9, 1-11). A diferencia de otras glicoproteínas plasmáticas, en las que los N-glicanos y especialmente los ácidos siálicos terminales son fácilmente accesibles, se sabe que los dos N-glicanos de Fc de IgG están protegidos por la estructura principal de proteína del dominio CH2. Esta alineación específica de los N-glicanos de Fc provoca un impedimento estérico que impide que cada ácido siálico con uniones  $\alpha$ 2,6 en la Fc de IgG1 pueda unirse a SNA. Por tanto, las glicovariantes de Fc de IgG<sub>1</sub> que portan un ácido siálico sólo en sus dos N-glicanos no se unirán a la lectina. Se realizaron ensayos de unión a lectina que miden selectivamente la  $\alpha$ 2,6-sialilación de IgG, sin introducir sesgo por la presencia de otras glicoproteínas sialiladas, porque la IgG humana se captura específicamente en la placa de ensayo. Este enfoque también se usa para evaluar la unión a SNA de IgG basándose en la medición de un plasma de referencia humano. Los resultados del ensayo de unión a SNA se notifican en la figura 12A, como porcentaje de SNA unida en la muestra de plasma de referencia. Se midieron muestras individuales por triplicado, y se ilustran los promedios para cada uno de los ocho

pares de muestras descritos anteriormente de las muestras en la figura 12B. Tal como se observa en la figura 12, en todos los casos, las fracciones de lavado a 2 M de intercambio catiónico tienen mayores actividades de unión a SNA relativas que las fracciones de eluato correspondientes. En cuatro de las muestras de fracción de lavado 2 M (LS12H254Z, LE12H302Z, LE12H303Z y LE12H304Z), la unión a SNA se enriqueció sustancialmente en comparación con la muestra de plasma de referencia.

*Ejemplo 7 - Análisis de N-glicanos totales de IgG presente en fracciones de eluato y de lavado con alto contenido de sal formadas durante la cromatografía de intercambio catiónico*

Los datos de los ensayos de unión a SNA, notificados en el ejemplo 6, justificaron una investigación adicional. En primer lugar, se realizó un análisis completo del patrón de N-glicanos de IgG presente en los pares de muestras de los lotes LE12H252Z, LE12H254Z y LE12H255Z. Los perfiles totales de N-glicanos para estas muestras se obtuvieron después de la liberación enzimática de los N-glicanos. Este análisis comparó los perfiles de N-glicanos independientemente de si el N-glicano derivaba o no de IgG. Esto debe tenerse en cuenta al comparar directamente los datos porque los N-glicanos de las glicoproteínas distintas de IgG contenidas en las muestras, tales como IgA e IgM, que están ambas altamente glicosiladas, también contribuyeron a estos datos. Los resultados de este análisis se presentan en la figura 13, que muestra la abundancia relativa de cada N-glicano.

Tal como se observa en estos resultados, las fracciones de lavado a 2 M de los lotes LE12H254Z y LE12H255Z tenían mayores niveles de N-glicanos mono y disialilados, mientras que la fracción de lavado 2 M del tercer lote contenía menores niveles de N-glicanos sialilados. Esto parece contrastar con los resultados del ensayo de unión a SNA, en el que todas las fracciones de lavado a 2 M mostraron una mayor unión a la lectina específica de ácido siálico, pero puede explicarse por la especificidad del ensayo de unión a lectina. Como las concentraciones de IgA e IgM sólo diferían moderadamente entre los tres lotes, la presencia de otras glicoproteínas parece ser el motivo más probable de estas diferencias.

*Ejemplo 8 - Análisis de N-glicanos de Fc de IgG<sub>1</sub> presente en fracciones de eluato y de lavado con alto contenido de sal formadas durante la cromatografía de intercambio catiónico*

Se determinó el contenido de N-glicanos de Fc de IgG<sub>1</sub> de las fracciones de lavado a 2 M y de eluato respectivas de los tres lotes de muestra sometidos a prueba en el ejemplo 7 mediante análisis por CL-EM de glicopéptidos tripticos, que permiten la identificación inequívoca de N-glicanos de Fc de IgG<sub>1</sub> basándose en secuencias de aminoácidos. Los resultados de este análisis se proporcionan en la figura 14, notificados como porcentajes relativos de los principales N-glicanos hallados en regiones Fc de IgG<sub>1</sub>. Los resultados individuales para los lotes LE12H252Z, LE12H154Z y LE12H255Z se ilustran en las figuras 15A-C, respectivamente.

Tal como se muestra en la figura 14, las tres fracciones de lavado a 2 M mostraron mayores niveles de sialilación de Fc de IgG<sub>1</sub> que las fracciones de eluato correspondientes, con diferencias absolutas bastante uniformes del 3,5%, el 4,0% y el 3,4%. Esto se tradujo en un aumento relativo del 30% en la sialilación de IgG<sub>1</sub> en las fracciones de eluato 2 M. Tal como se observa en las figuras 15A-15C, los tres pares de muestras mostraron una distribución similar de estructuras de N-glicano de Fc de IgG<sub>1</sub>. En todos los casos, se halló el N-glicano biantenarico monosialilado ANaF a mayores niveles en la fracción de lavado 2 M, mientras que los niveles del segundo N-glicano sialilado, GnNAF, mostraron sólo ligeras diferencias. Curiosamente, el glicano bigalactosilado AFF, un precursor de biosíntesis de ANaF, que es el sustrato para la sialiltransferasa, también se halló a mayores niveles en las fracciones de lavado a 2 M que en los eluatos correspondientes. En cambio, el glicano monogalactosilado AGnF estaba presente a menores niveles en la fracción de lavado 2 M que en los eluatos correspondientes. Los datos sugieren que IgG<sub>1</sub> en la fracción de lavado 2 M se caracteriza no sólo por el enriquecimiento de la sialilación sino también por el enriquecimiento de la galactosilación.

*Discusión*

La caracterización bioquímica presentada en el ejemplo 1-ejemplo 8 de la fracción de IgG minoritaria hallada en la fracción de lavado 2 M generada durante la regeneración de la resina cromatográfica de CM usada para el enriquecimiento de IgG derivadas de plasma, tal como se describe en la figura 1, proporciona evidencia de que la IgG perdida en esta etapa no es meramente representativa de la composición de IgG en su conjunto. Más bien, se halló que las IgG específicas para varios sustratos de péptidos A $\beta$  están enriquecidas en esta fracción de lavado. Además, el patrón de N-glicosilación de las IgG en la fracción de lavado varía con respecto al eluato de intercambio catiónico correspondiente, con mayores niveles de unión a la lectina SNA específica de ácido  $\alpha$ 2,6-neuramínico. Esta diferencia se confirmó mediante análisis por CL-EM del perfil N de Fc de IgG<sub>1</sub>, que reveló mayores concentraciones relativas de N-glicanos monosialilados en las fracciones de lavado a 2 M. La sialilación de la IgG humana se ha asociado con su actividad antiinflamatoria (Kaneko Y. *et al.*, Science 313, 670-673 (2006); y Anthony RM *et al.*, Science 320, 373-376 (2008)) aunque se han publicado datos (Bayry J. *et al.*, PNAS 106(9) (2009)) que sugieren que la sialilación de Fc de  $\alpha$ 2,6-IgG<sub>1</sub> podría no ser el único mecanismo involucrado en lo que se ha denominado la paradoja antiinflamatoria de IGIV (Nimmerjahn y Ravetch, J. Exp. Med. 204, 11-15 (2007)).

No obstante, estos estudios demuestran que la fracción de lavado 2 M de la etapa de enriquecimiento de IgG

expuesta de manera resumida en la figura 1 contiene mayores niveles de IgG sialiladas en Fc, lo que permite el uso de esta fracción, y fracciones similares, como material de partida para la purificación de esta subpoblación de IgG. Esta es una posibilidad atractiva que se ve alentada por el hallazgo de que esta fracción también contiene mayores niveles de IgG anti-A $\beta$  que el eluato correspondiente formado mediante cromatografía de intercambio catiónico. Los datos presentados anteriormente evidencian que la fracción de lavado 2 M está enriquecida para la unión a todos los confórmers de A $\beta$  investigados, especialmente cuando se realizó el ensayo de unión en condiciones de baja conductividad, en el que se redujo al mínimo la unión de fondo a los propios pocillos.

Los mayores niveles relativos de anticuerpos de la subclase IgG<sub>3</sub> en la fracción de lavado 2 M son interesantes, porque en comparación con las otras tres subclases de IgG, IgG<sub>3</sub> tiene una región bisagra extendida, lo que hace que esta subclase sea casi incapaz de unirse al receptor Fc neonatal en presencia de otras subclases de IgG, y también hace que sea altamente susceptible a la degradación proteolítica. Por otro lado, esta región bisagra extendida podría proporcionar elementos estructurales adicionales, aún no identificados, implicados en la unión no mediada por Fab a péptidos A $\beta$ , y estableciendo así una correlación directa entre una mayor unión a confórmers de A $\beta$  y los niveles de IgG<sub>3</sub>. Tal contribución de las regiones constantes de IgG a la unión a A $\beta$  se ha demostrado recientemente para la cadena pesada  $\gamma$  de IgG humana (Adekar SP *et al.*, Biol. Chem 285, 1066-1074 (2009)).

De manera significativa, los datos proporcionados anteriormente proporcionan una explicación de por qué, hasta ahora, no era posible mantener títulos de anticuerpos anti-A $\beta$ 42 enriquecidos durante la fabricación de preparaciones de inmunoglobulinas derivadas de plasma a gran escala, aunque se usaron materiales de partida que tenían un título 4 veces mayor, en comparación con los promedios para el plasma humano agrupado, como materiales de partida. Los resultados obtenidos en este caso demuestran que las IgG anti-A $\beta$  pueden perderse en la etapa de enriquecimiento cromatográfico de CM de los procesos de fabricación habituales.

*Ejemplo 9 - Purificación de composiciones de IgG a partir de fracciones de lavado con alto contenido de sal formadas durante el enriquecimiento mediante intercambio catiónico de IgG derivadas de plasma*

Dadas las propiedades inesperadas de la fracción de lavado con alto contenido de sal identificada en los ejemplos anteriores, se investigó si podía prepararse una composición de inmunoglobulina adecuada para uso farmacéutico a partir de esta fracción secundaria. Tal como se describe con detalle a continuación, se enriqueció la IgG de cinco muestras del lavado con cloruro de sodio 2 M formado durante la regeneración de la resina de intercambio catiónico usada para el enriquecimiento de IgG derivadas del plasma tal como se expone de manera resumida en la figura 1 (CHR435, CHR446, CHR456, CHR457 y CHR460), para dar una composición final. El análisis bioquímico de estas cinco composiciones reveló que cumplían o casi cumplían con cada una de las especificaciones de impurezas para las composiciones de IGIV derivadas de plasma. De manera notable, las composiciones finales tenían títulos de anticuerpos anti-RAGE, anti- $\alpha$ -sinucleína y anti-A $\beta$  que eran aproximadamente 20 veces, 50 veces y 80 veces mayores que los títulos promedio en las composiciones de IGIV preparadas mediante el método expuesto de manera resumida en la figura 1, respectivamente. En promedio, el rendimiento final de las composiciones de inmunoglobulinas anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral fue de 0,06 g por l de plasma de partida.

Se enriquecieron las cinco muestras descritas anteriormente, equivalente cada una a 750 l de material de partida de plasma, según el método expuesto de manera resumida en la figura 16. En resumen, se concentraron las fracciones de lavado a 2 M mediante ultrafiltración hasta una concentración objetivo del 1% de proteína (por ejemplo, 10 mg/ml). Luego se sometió la disolución concentrada a diafiltración frente a agua para reducir la conductividad hasta un objetivo de 6 mS/cm para cromatografía en CM Sepharose y 11 mS/cm para cromatografía en CM HyperD, y luego se concentró mediante ultrafiltración hasta una concentración final del 2% de proteína. Se filtró la disolución concentrada y se cargó en una columna de intercambio catiónico CM Sepharose o CM HyperD® (Pall Corporation).

Para la unión de IgG a CM Sepharose, se equilibró la columna con tampón que contenía acetato de sodio 10 mM (aproximadamente 0,85 mS/cm; pH 5,2) antes de la carga. Después de la carga, se lavó la columna con tampón que contenía acetato de sodio 10 mM (aproximadamente 0,85 mS/cm; pH 5,5). Luego se eluyeron las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico CM Sepharose con un tampón de elución que contenía fosfato monosódico 100 mM, Tris 10 mM (aproximadamente 13 mS/cm; pH 8,5).

Para la unión de IgG a CM HyperD, se equilibró la columna con tampón que contenía acetato de sodio 10 mM (aproximadamente 2 mS/cm; pH 5,2) antes de la carga. Después de la carga, se lavó la columna con tampón que contenía acetato de sodio 10 mM (aproximadamente 2 mS/cm; pH 5,5). Luego se eluyeron las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico CM HyperD con un tampón de elución que contenía fosfato monosódico 100 mM, Tris 10 mM (aproximadamente 13 mS/cm; pH 8,5).

Entonces se diluyeron los eluatos de intercambio catiónico para reducir la conductividad de la disolución hasta 2,2 mS/cm y ajustar el pH a 6,4. Luego se aplicaron las muestras diluidas a una columna de intercambio aniónico equilibrada con tampón que tenía una conductividad de 2,2 mS/cm. Se recogió la fracción no retenida de la resina de intercambio aniónico. Esta fracción no retenida se concentró luego hasta una concentración objetivo del 5% mediante ultrafiltración, se sometió a diafiltración frente a glicina 0,25 M, pH 4,2 y se concentró hasta una

concentración de proteína objetivo final del 10,2% mediante ultrafiltración. Se filtró de manera esterilizante el ultrafiltrado y luego se incubó a 30°C durante tres semanas.

5 Tal como se muestra en la tabla 3, el análisis de las composiciones de IgG enriquecidas a partir de la fracción de lavado de intercambio catiónico 2 M demuestra una recuperación de IgG mayor del 80% en las cuatro purificaciones usando resina de intercambio catiónico CM HyperD, y una recuperación de aproximadamente el 79% con resina CM Sepharose. El análisis bioquímico también muestra un bajo nivel de impurezas (por ejemplo, IgA, IgM, fibrinógeno y transferrina), todas las cuales están dentro de las especificaciones para la fabricación de IGIV derivada de plasma. La distribución de tamaño muestra que las composiciones purificadas con CM HyperD tienen más del 99,5% de IgG monomérica, mientras que la composición purificada con CM Sepharose contiene el 97,5% de IgG monomérica y el 2,5% de IgG fragmentada.

15 También se sometieron a prueba las composiciones finales para detectar marcadores de posibles actividades procoagulantes. Tal como se muestra en la tabla 4, las composiciones de IgG preparadas usando CM HyperD contenían niveles muy bajos de todos los marcadores sometidos a prueba.

Tabla 3. Análisis de proteína e impurezas en las composiciones de IgG finales preparadas a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

Parámetro	Unidad	CM Sepharose a granel CHR435	CM Hyper D a granel CHR446	CM Hyper D a granel CHR456	CM Hyper D a granel CHR457	CM Hyper D a granel CHR460	Especificaciones de fabricación de IGIV
Recuperación de proteína	% de NaCl 2 M	78,9	68,0	70,1	75,1	64,8	-
Recuperación de IgG (ELISA)	% de NaCl 2 M	78,8	88,0	81,2	92,6	83,5	-
IgA (ELISA)	mg/ml (al 10% de TPUV)	0,021	0,015	0,021	0,022	0,025	≤ 0,14
IgM (ELISA)	mg/ml (al 10% de TPUV)	0,0013	0,0017	0,0011	0,0027	0,0016	-
Fibrinógeno	mg/ml (al 10% de TPUV)	0,00035	< 0,00014	< 0,00016	0,00097	< 0,00028	-
Transferrina	mg/ml (al 10% de TPUV)	0,0011	0,00118	0,00111	0,00105	0,00105	-
MSD VIE	Agregados (> 450 kDa) [%]	0,04	0,07	0,05	0,08	0,03	≤ 2
	Monómeros/dímeros (160 - 320 kDa) [%]	97,5	99,8	99,79	99,8	99,65	≥ 95
	Fragmentos (<60 kDa) [%]	2,5	0,13	0,16	0,11	0,31	≤ 3
CZE (FC)	% de γ-globulina	98	100	100	100	100	≥ 98
ACA	%	57	43	44	45	53	< 50

20 Tabla 4. Análisis bioquímico de marcadores para actividades procoagulantes potenciales en composiciones de IgG finales preparadas a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

Parámetro	Unidad	FC Sepharose CHR435	FC Hyper D CHR446	FC Hyper D CHR456	FC Hyper D CHR457	FC Hyper D CHR460	Espec.*/Media/Intervalo de fabricación de IGIV
Actividad amidolítica	nmol/ml min	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Zimógeno FXI	mU/ml	0,18	< 0,01	< 0,01	0,02	< 0,01	-
FXIa	ng/ml	2,51	< 0,2	< 0,5	< 0,5	< 0,5	-

NAPTT (plasma con FXI)	mg	> 10,2	> 11,4	> 10	> 9,4	> 10,4	-
PKA	IE/ml	< 4	< 4	< 4	< 4	<4	< 10*
SN13 a	mU/ml actividad similar a FXI	6,3	< 0,39	< 0,39	< 0,39	<0,39 (a granel)	
TGA	% de NP	137,1	118,8	120,9	124,1	115,1	132,2

5 El título de anticuerpos específicos se determinó a continuación en la composición preparada usando resina de intercambio catiónico CM Sepharose (CHR435) y una de las composiciones preparadas usando resina de intercambio catiónico CM HyperD (CHR460). Tal como se muestra en la tabla 5, el contenido de todos los anticuerpos específicos sometidos a prueba satisfizo los requisitos de especificación para la fabricación de IGIV. Se determinó el contenido de varios anticuerpos anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral en relación con los niveles promedio en composiciones de IGIV a gran escala preparadas según el método expuesto de manera resumida en la figura 1. De manera significativa, el nivel de anticuerpos anti-RAGE, anti- $\alpha$ -sinucleína y anti-A $\beta$  en las composiciones finales fueron aproximadamente 20 veces, 50 veces y 80 veces mayores, en comparación con los niveles en las composiciones de IGIV a gran escala preparadas según el método expuesto de manera resumida en la figura 1. El contenido de anticuerpos anti-A $\beta$  específicos para diferentes formas de A $\beta$  (por ejemplo, fibrillas, oligómeros, A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42) para las dos composiciones sometidas a prueba se muestra en la tabla 6, como una razón de contenido en comparación con el contenido medio de 3 lotes de una preparación de IGIV comercial. El contenido de anticuerpos adicionales en las composiciones de fracción de lavado de CM con alto contenido de sal se muestra en la tabla 7.

Tabla 5. Títulos de varios anticuerpos sometidos a prueba normalmente en composiciones de IgG humanas agrupadas, en las composiciones de IgG finales preparadas a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

Parámetro	Unidad	FC Sepharose CHR435	CM FC CM Hyper D CHR460	Espec.*/Media/ Intervalo de fabricación de IGIV
Anticuerpo anti-A	Título	1:2	1:4	1: < 64*
Anticuerpo anti-B	Título	1:2	1:2	1: < 64*
Anticuerpo anti-D	-	Satisfactorio	Satisfactorio	Satisfactorio*
Anticuerpo anti-HBs	UI/ml	6,38	9,94	$\geq 0,20^*$ UI/ml
Anticuerpo antidiftérico	U/ml de norma de los EE.UU.	14	11	$\geq 1,2^*$ U de antitoxina de la norma de los EE. UU./ml
Polio	Cita gg. Lote 176	n.d.	0,29	$\geq 0,20^*$ Cita gg. Lote 176
Antitoxina tetánica	UI/ml	n.d.	160,9	
CMV	U PEI/ml	n.d.	218	
VHA	UI/ml	n.d.	11,5	
Parvo B19	UI/ml	n.d.	1935	

20 Tabla 6. Niveles de anticuerpos anti-A $\beta$  en las composiciones de IgG finales preparadas a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

Anticuerpo amiloide anti- $\beta$ -	CHR435		CHR460	
	CM Sepharose ff		CM Hyper D	
	DO/ $\mu$ g	Razón con respecto a IGIV	DO/ $\mu$ g	Razón con respecto a IGIV
Fibrillas	2,9	81	2,6	74
Oligómeros	5,7	87	5,6	85

Aβ40	4,1	<b>75</b>	3,7	<b>66</b>
Aβ42	7,4	<b>96</b>	5,8	<b>76</b>

Tabla 7. Niveles de sialilación, autoanticuerpos y anticuerpos relacionados con enfermedad cerebral en las composiciones de IgG finales preparadas a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

	Unidad	FC CM Sepharose ff	FC CM Ceramic Hyper D 4	Intervalo/media de 3 lotes de IGIV comerciales
IgG-SNA	% plasma	80,1	80,5	65,2-94,8
IgG anti-ADN	razón con respecto a IGIV	3,0	3,2	-
IgG anti-tubulina	razón con respecto a IGIV	2,0	2,1	-
IgG anti-rHuPH20	µg/ml	< 6,5	11,2	10,3
IgG anti-RAGE	razón con respecto a IGIV	4,5	22,4	-
IgG anti-α sinucleína	razón con respecto a IGIV	53,1	51,2	-

5 Se separaron las subclases de IgG en una de las composiciones finales, usando Capture Select IgG 4 y Mab Select SuRe. El análisis de las fracciones de subclases se presenta en la tabla 8. Un análisis adicional de las composiciones de subclases reveló que los anticuerpos anti-RAGE están enriquecidos en las subclases IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub>, y que los anticuerpos anti-Aβ están enriquecidos en las fracciones de subclases IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>1</sub>.

10 Tabla 8. Análisis del contenido de subclases de IgG en una composición de IgG final preparada a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

	Subclases de IgG			
	IgG 1	IgG 2	IgG 3	IgG 4
Material de partida FC	58%	16%	25,5%	0,5%
FC IgG 4	<7%	<b>55%</b>	<6%	<b>32%</b>
FC D	< 0,6%	< 0,4%	<b>97%</b>	2%
FC E2	19%	<b>71%</b>	10%	< 0,2%
FC E3	<b>96%</b>	23%	0,7%	0,3%

15 Se determinaron los contenidos de proteína C3 y factor I de las composiciones finales FC CM Sepharose CHR435 y FC CM Hyper D CHR460. Tal como se muestra en la tabla 9, los niveles de ambas proteínas son menores en las preparaciones de fracción de lavado de CM con alto contenido de sal que en una preparación de IGIV comercial.

Tabla 9. Contenido de C3 del complemento y factor I en la composición de IgG final preparada a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

	Unidad	FC CM Sepharose ff	FC CM Ceramic Hyper D 4	IGIV comercial
C3 del complemento	g/l	0,00036	< 0,00031	0,0012
Factor I	g/l	0,00535	0,00250	0,025

20 El patrón de isoelectroenfoco de las preparaciones de fracción de lavado de CM con alto contenido de sal es diferente al de las preparaciones de IGIV comerciales. Se realizó un análisis de isoelectroenfoco para las composiciones finales FC CM Sepharose CHR435 y FC CM Hyper D CHR460 y se comparó con tres lotes de un producto de IGIV comercial. Tal como se muestra en la figura 20, los lotes de IGIV comerciales (carriles 3-5) mostraron un intervalo de pI de 5,7 a 9,3. En cambio, los intervalos de pI de las composiciones finales producidas a partir de las fracciones de lavado de CM con alto contenido de sal (carril 6: FC CM Sepharose ff; carril 7: FC CM Ceramic Hyper D 4) se desplazaron mayores a intervalos de pI. La población de IgG en las preparaciones de fracción de lavado de CM con alto contenido de sal consistió principalmente en proteínas que tenían pI a entre pH

8,5 y 9,5. Solo eran visibles en el gel señales débiles, entre pl de 8,5 y 7 y por debajo de un pl de 6,55.

El desplazamiento de pl a mayores valores se explica, al menos en parte, por el método de producción empleado. La población de IgG inicial en la fracción de lavado de CM con alto contenido de sal es la porción del contenido de IgG total que no eluye de la resina de intercambio catiónico en condiciones de elución convencionales. Una explicación para una afinidad de unión más fuerte a la resina de intercambio catiónico es un mayor valor de pl. Por tanto, no es inesperado que esta fracción particular contenga moléculas de IgG que tengan una mayor distribución promedio de los valores de pl.

El análisis mediante SDS-PAGE realizado en condiciones reductoras y no reductoras también se realizó para las dos composiciones de fracción de lavado de CM con alto contenido de sal y se comparó con los tres lotes de IGIV comercial. Tal como se muestra en la figura 21A, no hubo diferencias importantes en el perfil no reductor de las preparaciones de fracción de lavado de CM (carril 5: FC CM Sepharose ff; carril 6: FC CM Ceramic Hyper D 4) y lotes de IGIV comerciales (carriles 2-4 ). En todos los carriles, era visible una banda clara a 150 kDa, correspondiente a IgG monomérica (~150 kDa). Sin embargo, se observó una banda débilmente teñida a 40 kDa en las preparaciones de fracción de lavado de CM con alto contenido de sal, pero no en las preparaciones de IGIV comerciales.

Tal como se muestra en la figura 21B, los perfiles reductores de las preparaciones de fracción de lavado de CM con alto contenido de sal (carril 5: FC CM Sepharose ff; carril 6: FC CM Ceramic Hyper D 4) variaron con respecto a los perfiles de las preparaciones de IGIV comerciales por la presencia de una banda más pronunciada a aproximadamente 60 kDa. Esta banda corresponde probablemente a la cadena pesada de IgG<sub>3</sub>, que es más grande que las cadenas pesadas de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub>. Tal como se muestra en la tabla 10, el contenido de IgG<sub>3</sub> de las fracciones de lavado de CM con alto contenido de sal está altamente enriquecido, en comparación con el contenido en plasma humano normal.

Tabla 10. Distribución de subclases de IgG de la composición de IgG final preparada a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

	Subclases de IgG			
	IgG1 [%]	IgG2 [%]	IgG3 [%]	IgG4 [%]
FC CM Sepharose ff	60,9	14,8	23,9	0,5
FC CM Ceramic Hyper D 4	58,1	15,7	25,7	0,5
Suero Humano Normal	60,3-75,0	16,7-31,0	5,0-8,4	0,7-4,2

Se usó el un sistema *in vitro* en humanos para analizar los posibles efectos moduladores de las composiciones de IgG preparadas a partir de las fracciones de lavado de CM con alto contenido de sal y una composición de IGIV comercial sobre las funciones efectoras en ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). En resumen, se incubaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC, por sus siglas en inglés) purificadas por gradiente de densidad de donantes humanos sanos con medio de cultivo, las composiciones de IgG preparadas a partir de las fracciones de lavado de CM de alta concentración de sal, de un producto de IGIV comercial, a concentraciones de proteína iguales. La ADCC se determinó lavando las PBMC con medio libre de suero y añadiendo las células en una razón de 20:1 a las células de cáncer de mama SK-BR3 humano opsonizadas con herceptina. El daño citotóxico a las células SK-BR3 se determinó midiendo la liberación de LDH. Se calculó la ADCC según la fórmula a continuación. Tal como se muestra en la tabla 11, las actividades de ADCC de las composiciones de IGG preparadas a partir de las fracciones de lavado de CM con alto contenido de sal fueron del 70% al 100% mayores que la del producto de IGIV comercial.

$$ADCC = \frac{100(Exp_{Her10-300} - Exp_{Her0})}{(S_{max} - S_{spo})}$$

*Exp<sub>Her10-300</sub>, Exp<sub>Her0</sub> - liberación experimental de LDH en presencia y ausencia de herceptina*  
*S<sub>max</sub> - liberación máxima de LDH*  
*S<sub>spo</sub> - liberación espontánea de LDH.*

Tabla 11. Modulación de ADCC por la composición de IgG final preparada a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

	número de donantes	ADCC [%] Razón entre el lote de referencia de IGIV y la muestra de prueba
FC CM Sepharose ff	4	199,9 ± 33,1
FC CM Ceramic Hyper D 4	4	171,5 ± 9,0

5 Para una caracterización adicional, se separó adicionalmente la composición de IgG purificada a partir de la fracción de lavado de CM con alto contenido de sal usando resina CM Ceramic Hyper D en subclases de IgG individuales usando resinas cromatográficas Capture Select IgG4 y Mab Select SuRe. Se muestran los resultados de la separación en la tabla 12 y la tabla 13.

Tabla 12. Recuperación del fraccionamiento de subclases de IgG de la composición de IgG final preparada a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

	Subclases de IgG: recuperación [%]			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
FC de IgG1	85,1	7,4	1,4	< 10,6
FC de IgG2	8,4	88,1	9,8	< 0,66
FC de IgG3	0,02	0,06	76,1	< 0,54
FC de IgG4	0,09	1,1	0,16	87,6

10 Tabla 13. Pureza de las composiciones de subclases de IgG separadas de la composición de IgG final preparada a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

	Subclases de IgG: pureza [%]			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
FC de IgG1	96,6	2,6	0,7	<0,14
FC de IgG2	21,0	67,7	11,2	<0,02
FC de IgG3	0,07	0,05	99,9	<0,02
FC de IgG4	5,7	22,1	4,9	67,3

15 Los títulos de anticuerpos que se unen específicamente a SNA, autoanticuerpos y anticuerpos relacionados con enfermedad cerebral se determinaron para cada una de las preparaciones de subclases de IgG y se compararon con los niveles en una preparación de IGIV comercial. Los resultados de estos análisis se presentan en la tabla 14. En particular, se halló que los anticuerpos anti-RAGE estaban elevados para todas las preparaciones de subclases, en comparación con el producto de IGIV comercial. Este enriquecimiento fue de más de 10 veces en las composiciones de IgG2 e IgG3, de 91 veces en la composición de IgG4 y de 156 veces en la composición de IgG1.

20 Los anticuerpos anti- $\alpha$ -sinucleína se enriquecieron de 7 a 32 veces, en comparación con el producto de IGIV comercial, en las diversas preparaciones de subclases. Los diversos títulos de anticuerpos anti- $\beta$  amiloide estaban elevados en las preparaciones de subclases IgG1, IgG2 e IgG3, pero no en la composición de IgG4. En la composición de IgG2, los títulos de anticuerpos anti-A $\beta$  se enriquecieron entre 42 y 70 veces. En la composición de IgG1, estos títulos se enriquecieron entre 58 y 114 veces. En la composición de IgG3, estos títulos se enriquecieron

25 entre 108 y 160 veces.

Tabla 14. Caracterización de títulos de anticuerpos en composiciones de subclases de IgG separadas de la composición de IgG final preparada a partir de la fracción de lavado con cloruro de sodio 2 M formada en el método expuesto de manera resumida en la figura 1.

	Unidad	FC de IgG1	FC de IgG2	FC de IgG3	FC de IgG4	Media/intervalo Líquido Gammagard (GGL)
IgG-SNA	DO/mg	3,0	2,2	1,7	5,3	2,2
	% plasma	92,7	67,7	51,3	142,9	65,2-94,8
IgG anti-ADN	razón con respecto a GGL	3,6	2,6	2,9	1,2	-
IgG anti-tubulina	$\mu$ g/ml	1,7	1,8	2,3	1,2	1,2
	razón con respecto a GGL	1,4	1,5	1,9	1,0	-
IgG anti-rHuPH20	$\mu$ g/ml	13,2	1,3	4,9	0,65	-

IgG anti-PCP	μg/ml	480	367	32,6	3,3	920,8
	razón con respecto a GGL	0,52	0,40	0,035	0,0036	-
IgG anti-Hib	μg/ml	89,2	> 192	0,89	0,47	28,6
	razón con respecto a GGL	3,1	> 6,7	0,031	0,016	-
IgG anti-RAGE	razón con respecto a GGL	155,7	11,1	13,9	90,9	
IgG anti-α sinucleína	razón con respecto a GGL	29,0	16,3	32,6	7,3	-
IgG anti-β-amiloide 40	razón con respecto a GGL	88,8	55,2	129,7	0,58	-
IgG anti-β-amiloide 42	razón con respecto a GGL	58,2	58,6	108,3	0,8	-
IgG anti-oligómeros de β-amiloide 40	razón con respecto a GGL	114,0	70,2	160,8	1,1	-
IgG anti-fibrillas de β-amiloide 40	razón con respecto a GGL	83,9	42	144,3	1,67	-

*Ejemplo 10 - Caracterización de fracciones de lavado con alto contenido de sal formadas durante el enriquecimiento mediante intercambio catiónico de IgG derivadas de plasma*

- 5 Para caracterizar adicionalmente la composición proteica de la fracción de lavado con alto contenido de sal formada durante el enriquecimiento mediante intercambio catiónico de IgG derivadas de plasma, se recuperaron las fracciones de lavado de tres preparaciones de IgG a gran escala. El pH de las tres fracciones osciló desde 8,5 hasta 8,8. Tal como se muestra en la tabla 15, la concentración de proteína promedio de las fracciones fue de 0,14% (1,4 g/l), un rendimiento de aproximadamente 0,071 gramos de proteína por litro de plasma de partida. El contenido de IgG promedio en las fracciones fue del 82,9% (g de IgG/g de proteína total), tal como se determinó mediante nefelometría. Los contenidos de IgA e IgM promedio de las fracciones fueron del 4,12% y el 2,84% (g/g de proteína total), respectivamente, tal como se determinó mediante ELISA.

15 Tabla 15. Caracterizaciones bioquímicas de fracciones de lavado con alto contenido de sal de CM a partir de la purificación de IgG a gran escala.

Fracción de limpieza de CM	TPUV		Nefelometría de IgG		ELISA de IgA	ELISA de IgM
	[%]	[g/l plasma]	[% de TP]	[g/l plasma]	[% de TP]	[% de TP]
LE12L369Z	0,13	0,078	n.d.	n.d.	3,70	1,61
LE12M177Z	0,12	0,083	81,4	0,067	4,24	3,39
LE12N036Z	0,16	0,052	84,4	0,044	4,41	3,54
<b>Media</b>	<b>0,14</b>	<b>0,071</b>	<b>82,9</b>	<b>0,056</b>	<b>4,12</b>	<b>2,84</b>
n.d. = no determinado						

- 20 Luego se sometieron las fracciones a ultra/diafiltración para reducir sus conductividades y concentrar la proteína, tal como se describe en el presente documento, y luego se sometieron a filtración esterilizante. La distribución del peso molecular de las fracciones después de la filtración se determinó entonces mediante cromatografía de exclusión molecular - de líquidos de alto rendimiento (HP-SEC). Tal como se muestra en la tabla 16, la IgG monomérica, correspondiente al pico principal centrado en 160 kDa, constituía aproximadamente el 70% de la proteína en las

fracciones. Los porcentajes promedio relativamente altos de dímero de inmunoglobulina, aproximadamente el 20%, y el oligómero, aproximadamente el 7%, se explican parcialmente por los contenidos de IgA e IgM de la fracción. La IgA existe normalmente como un dímero de inmunoglobulina, mientras que la IgM es un pentámero de inmunoglobulina.

5 Tabla 16. Distribuciones de peso molecular de las fracciones de lavado con alto contenido de sal de CM a partir de la purificación de IgG a gran escala

Filtrado estéril de concentrado de fracción de limpieza de CM	Distribución del tamaño molecular [%]			
	> 450 kDa	~ 350 kDa	~ 160 kDa	<110 kDa
LE12L369Z	4,2	20,1	72,8	3,0
LE12M177Z	7,1	21,3	68,5	3,2
LE12N036Z	9,4	19,5	66,2	4,8
<b>Media</b>	<b>6,9</b>	<b>20,3</b>	<b>69,2</b>	<b>3,6</b>

10 La distribución de las subclases de IgG en una de las fracciones de lavado se determinó mediante separación cromatográfica usando las resinas Capture Select IgG4 y Mab Select SuRe. Tal como se muestra en la tabla 17, el contenido de la subclase IgG<sub>3</sub> en la fracción (25%) se enriqueció enormemente en comparación con un contenido típico en plasma humano normal (5,0-8,4%). El contenido de cada una de las subclases IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> estaba en el extremo inferior de una distribución típica en plasma humano normal.

15 Tabla 17. Análisis de la distribución de subclases de IgG en una fracción de lavado con alto contenido de sal de CM a partir de la purificación de IgG a gran escala.

Filtrado estéril de concentrado de fracción de limpieza de CM	Subclases de IgG			
	IgG1 [%]	IgG2 [%]	IgG3 [%]	IgG4 [%]
LE12N036Z	57,42	16,73	25,18	0,66

20 *Ejemplo 11 - Ultrafiltración de una fracción de lavado con alto contenido de sal formada durante el enriquecimiento mediante intercambio catiónico de IgG derivadas de plasma*

Para cargar la fracción de alto lavado con alto contenido de sal en una resina de intercambio catiónico posterior, es necesario reducir la conductividad de la fracción. Un medio para lograr esto es mediante ultra/diafiltración. Para determinar las condiciones apropiadas para la ultra/diafiltración, se sometieron a diafiltración muestras de una de las fracciones de lavado de CM con alto contenido de sal descrita en el ejemplo 10 en tampón a pH 5,0, 6,0 ó 7,0, y luego se concentraron mediante ultrafiltración. Se monitorizó el contenido de agregados de las muestras durante la concentración. Tal como se observa en la figura 17A, la agregación de proteínas aumentó con la concentración de proteína creciente, desde 10 g/l hasta 80 g/l, cuando las fracciones se sometieron a diafiltración en tampón a pH 5,0 (◆) y pH 6,0 (▲). Sin embargo, la agregación de proteínas no aumentó durante la ultrafiltración a pH 7,0 (■). Para determinar si la fracción era estable a lo largo del tiempo a este pH, se concentró una muestra sometida a diafiltración en tampón a pH 7,0 y una conductividad de 11,5 mS/cm, al 2% de proteína (20 g/l) y se almacenó durante siete meses. Se monitorizó la distribución de tamaño molecular de la muestra durante el almacenamiento. Tal como se muestra en la figura 17B, no hubo cambios en el perfil de distribución de peso molecular en el transcurso del experimento, lo que sugiere que la muestra es estable a pH 7,0.

35 *Ejemplo 12: Filtración esterilizante de una fracción de lavado con alto contenido de sal sometida a ultra/diafiltración formada durante el enriquecimiento mediante intercambio catiónico de IgG derivadas de plasma*

Para determinar los efectos de la concentración de proteína, el pH y la conductividad sobre la recuperación de IgG, IgA e IgM durante la filtración esterilizante tras la ultra/diafiltración, se realizó una serie de experimentos en diversas condiciones. En resumen, se sometieron a ultra/diafiltración muestras de una fracción de lavado de CM con alto contenido de sal a concentraciones de proteína que variaron desde el 0,2% (2 g/l) hasta el 1,5% (15 g/l), a un pH de desde 5,0 hasta 7,0, y una conductividad de desde 1 mS/cm hasta 8 mS/cm. Se filtraron las muestras a través de un filtro SARTOBRAN® P (0,45/0,2 µm) y se determinaron los contenidos de IgG, IgA e IgM del filtrado. Se muestran los resultados de los experimentos en las figuras 18A-18J.

45 Las figuras 18A-18B muestran un diagrama de contorno del contenido de IgG (como % de proteína total) recuperado en el filtrado de muestras concentradas hasta el 1,5% (15 g/l) y el 0,85% (8,5 g/l), respectivamente, a valores de pH que oscilaron desde 5,0 hasta 7,0 y conductividades de desde 1,0 mS/cm hasta 8,0 mS/cm. Tal como se muestra en estas figuras, el contenido de IgG máximo se halla después de la filtración a combinaciones de pH/conductividad de pH 5,0 y 8,0 mS/cm, así como de pH 7,0 y 1,0 mS/cm. El contenido de IgG mínimo se halla después de la filtración a combinaciones de pH/conductividad de pH 5,0 y 1,0 mS/cm, así como de pH 7,0 y 8,0 mS/cm. La figura

18C muestra un gráfico de contorno del contenido de IgG (como % de proteína total) recuperado en el filtrado de muestras sometidas a diafiltración en tampón a pH 5, concentraciones de proteína que oscilan desde el 0,2% (2 g/l) hasta el 1,5% (15 g/l), y una conductividad que oscila desde 1,0 mS/cm hasta 8,0 mS/cm. Tal como se muestra en la figura 18C, el contenido de IgG creciente se correlacionó con una conductividad creciente a pH 5,0, pero en gran medida no se vio afectado por la concentración de proteína total. De manera similar, el contenido de IgA mostró una correlación positiva con la conductividad creciente a pH 5, pero mostró sólo una ligera correlación con la concentración de proteína a conductividades mayores de 5,0 mS/cm (figura 18D).

La recuperación de IgM y el contenido en el filtrado de muestras sometidas a ultra/diafiltración hasta una concentración de proteína final del 1,5% (15 g/l) o el 0,85% (8,5 g/l) dependían tanto del pH como de la conductividad. Tal como se muestra en las figuras 18E-18G, la recuperación y el contenido de IgM disminuyeron con pH creciente y aumentaron con conductividad creciente. Tal como se muestra en la figura 18H, el contenido de IgM en el filtrado se correlacionó positivamente con el aumento de la conductividad, pero no se relacionó con la concentración de proteína final, a pH 6,0. Sin embargo, los resultados presentados en la figura 18I muestran una correlación positiva entre el contenido de IgM en el filtrado y la conductividad creciente, así como una correlación negativa entre el contenido de IgM y la concentración de proteína total a pH 5,0.

Se superpusieron representaciones gráficas de contorno de IgG, IgA e IgM a pH 5,0 para determinar las condiciones de trabajo (a pH 5,0), que proporcionan una alta recuperación de IgG en el filtrado y reducen las recuperaciones de IgA e IgM. Este espacio de trabajo se ilustra como el área blanca de la figura 18A.

*Ejemplo 13 - Enriquecimiento cromatográfico de IgG a partir de una fracción de lavado con alto contenido de sal sometida a filtración esterilizante formada durante el enriquecimiento por intercambio catiónico de IgG derivadas de plasma*

Se sometieron a diafiltración porciones de una fracción de lavado de CM con alto contenido de sal en tampón a pH 5,2 y una conductividad de o bien 6 mS/cm o bien 11 mS/cm y luego se sometieron a ultrafiltración hasta una concentración de proteína final del 0,7% (7 g/l) o el 1,7% (17 g/l). se registraron las curvas de ruptura en CM Sepharose ff y CM Ceramic Hyper D usando las muestras sometidas a ultra/diafiltración a diferentes conductividades de partida y concentraciones para evaluar las capacidades de carga para el filtrado concentrado de fracción de limpieza de CM. Para estos experimentos, se usaron columnas con un volumen de resina de 31 ml. Tal como se muestra en la figura 19, la resina CM Ceramic Hyper D proporcionó una mayor capacidad de carga que la resina CM Sepharose ff, y la reducción de la conductividad del material de carga desde 11 mS/cm hasta 6 mS/cm aumentó adicionalmente la capacidad de carga.

Luego se eluyeron las resinas CM Sepharose ff y CM Ceramic Hyper D cargadas con cantidades variables de proteína y se caracterizó la recuperación de IgG, IgA e IgM. Tal como se muestra en la tabla 18, el uso de resina CM Sepharose ff proporcionó una mayor reducción del contenido de IgA e IgM, sin embargo, el uso de resina CM Ceramic Hyper D proporcionó una mayor recuperación del contenido de IgG.

Tabla 18. Análisis de la distribución de subclases de IgG en una fracción de lavado con alto contenido de sal de CM a partir de la purificación de IgG a gran escala.

	Carga de proteína [mg de proteína/ ml de resina]	Conductividad de carga [mS/cm]	Etapas de recuperación de IgG [%]	Etapas de recuperación de IgA [%]	Etapas de recuperación de IgM [%]	MSD <110 kDa [%]
CM Sepharose ff	105	6	91	85	38	2,54
CM Sepharose ff	150	6	76	56	19	3,02
CM Ceramic Hyper D	150	6	99	63	70	2,46
CM Ceramic Hyper D	90	11	103	78	85	1,80

Se ajustaron luego los eluatos de CM a un pH de 6,4 y una conductividad de  $\geq 1$  mS/cm, se filtraron a través de un filtro SARTOBRAN® P (0,45/0,2  $\mu$ m) y se cargaron en una resina ANX Sepharose ff. Luego se sometió a ultra/diafiltración la fracción no retenida usando una membrana de UF/DF de PES y se sometió a otras filtraciones esterilizantes para proporcionar un producto a granel. El contenido de péptidos pequeños (MSD <110 kDa) en las distintas etapas se caracterizó para cuatro muestras, una de las cuales se enriqueció usando resina CM Sepharose ff (ejecución 1) y tres de las cuales se enriquecieron usando resina CM Ceramic Hyper D (ejecuciones 2-4). Tal como se observa en la tabla 19, el uso de resina CM Ceramic Hyper D, pero no de la resina CM Sepharose ff, redujo el contenido de péptidos más pequeños en la composición.

Tabla 19. Reducción de proteínas <110 kDa durante el proceso posterior usando CM Sepharose ff (ejecución 1) y CM Ceramic Hyper D (ejecuciones 2 a 4).

	MSD <110 kDa [%]			
	Ejecución 1	Ejecución 2	Ejecución 3	Ejecución 4
Filtrado estéril de concentrado de fracción de limpieza de CM	2,95	2,31	2,24	2,78
Filtrado 1 de Sartobran	3,16	2,27	2,36	2,69
Eluato de CM	2,54	1,80	1,89	2,18
Filtrado 2 de Sartobran	2,56		0,52	0,38
A granel	2,49	0,16	0,11	0,31

5 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son sólo con propósitos ilustrativos y que se le sugerirán a los expertos en la técnica diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos y han de estar incluidos dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en el presente documento se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad con cualquier propósito.

10

**REIVINDICACIONES**

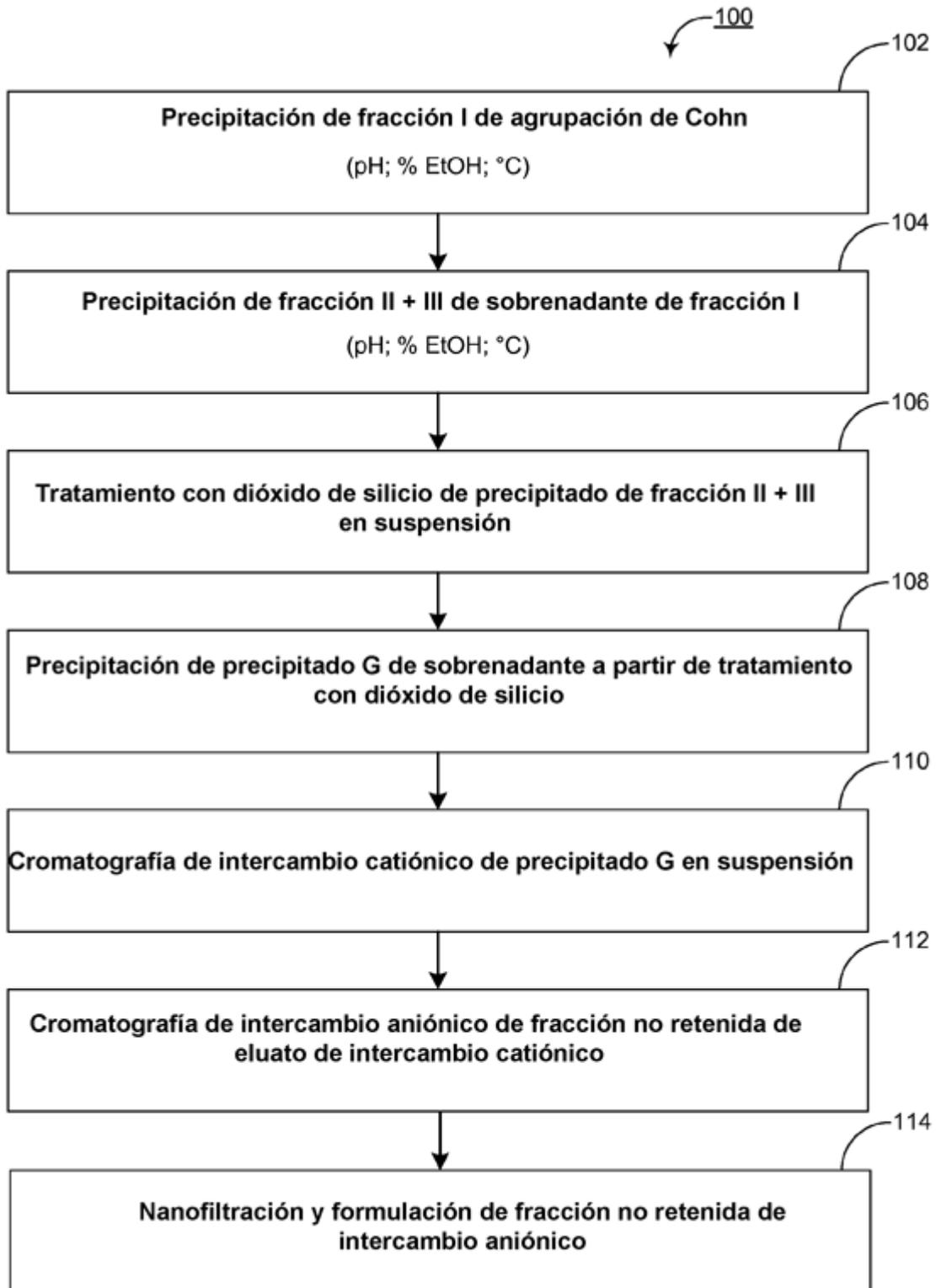
1. Método para preparar una preparación de inmunoglobulina enriquecida en inmunoglobulinas relacionadas con enfermedad cerebral, comprendiendo el método las etapas de:
- (A) proporcionar una composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG, incluyendo las inmunoglobulinas IgG una inmunoglobulina anti-beta-amiloide, una inmunoglobulina anti-RAGE, una inmunoglobulina anti- $\alpha$ -sinucleína, u otra inmunoglobulina específica para una proteína relacionada con enfermedad cerebral;
- (B) unir las inmunoglobulinas IgG a un material de intercambio catiónico;
- (C) eluir la mayoría de las inmunoglobulinas IgG unidas del material de intercambio catiónico, en una primera etapa de elución de intercambio catiónico, usando un primer tampón de elución de intercambio catiónico que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 3,0 mS/cm a 16,0 mS/cm;
- (D) eluir las inmunoglobulinas IgG que permanecen unidas al material de intercambio catiónico, en una segunda etapa de elución de intercambio catiónico, usando un segundo tampón de elución de intercambio catiónico que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 10,0 mS/cm a 300,0 mS/cm; y
- (E) recuperar un eluato enriquecido en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide, inmunoglobulinas anti-RAGE e inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en la etapa (A) tiene un título mayor de una inmunoglobulina anti-beta-amiloide, una inmunoglobulina anti-RAGE, una inmunoglobulina anti- $\alpha$ -sinucleína, u otra inmunoglobulina específica para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, en comparación con el título de una composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma preparada a partir de una agrupación de plasmas que contiene plasma de 1.000 donantes al azar.
3. Método para preparar una preparación de inmunoglobulina enriquecida en inmunoglobulinas anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa, comprendiendo el método las etapas de:
- (A) proporcionar una composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG, incluyendo las inmunoglobulinas IgG, una inmunoglobulina anti-Hib, inmunoglobulina anti-Hbs, inmunoglobulina anti-PV1, inmunoglobulina anti-VHA, inmunoglobulina anti-CMV, inmunoglobulina antitetánica, inmunoglobulina anti-parvo B19 o inmunoglobulina antidiftérica;
- (B) unir las inmunoglobulinas IgG a un material de intercambio catiónico;
- (C) eluir la mayoría de las inmunoglobulinas IgG unidas del material de intercambio catiónico, en una primera etapa de elución de intercambio catiónico, usando un primer tampón de elución de intercambio catiónico que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 3,0 mS/cm a 16,0 mS/cm;
- (D) eluir las inmunoglobulinas IgG que permanecen unidas al material de intercambio catiónico, en una segunda etapa de elución de intercambio catiónico, usando un segundo tampón de elución de intercambio catiónico que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 10,0 mS/cm a 300,0 mS/cm; y
- (E) recuperar un eluato enriquecido en una inmunoglobulina anti-Hib, inmunoglobulina anti-Hbs, inmunoglobulina anti-PV1, inmunoglobulina anti-VHA, inmunoglobulina anti-CMV, inmunoglobulina antitetánica, inmunoglobulina anti-parvo B19, inmunoglobulina antidiftérica, o una combinación de las mismas.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material de intercambio catiónico es un material de intercambio catiónico débil, preferiblemente, una resina de intercambio catiónico de carboximetilo.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- (a) el primer tampón de elución de intercambio catiónico tiene un pH de 7,0 a 9,5; o
- (b) el primer tampón de elución de intercambio catiónico tiene un pH de 8,0 a 9,0.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

- (a) el primer tampón de elución de intercambio catiónico tiene una conductividad de 4,0 mS/cm a 15,0 mS/cm; o
- 5 (b) el primer tampón de elución de intercambio catiónico tiene una conductividad de 5,0 mS/cm a 8,0 mS/cm.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer tampón de elución de intercambio catiónico tiene un pH de  $8,5 \pm 0,2$  y una conductividad de  $5,0 \pm 1$  mS/cm.
- 10 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- (a) el segundo tampón de elución de intercambio catiónico tiene un pH de 7,0 a 9,5; o
- (b) el segundo tampón de elución de intercambio catiónico tiene un pH de 8,0 a 9,0.
- 15 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:
- (a) el segundo tampón de elución de intercambio catiónico tiene una conductividad de 80 mS/cm a 150 mS/cm; o
- 20 (b) el segundo tampón de elución de intercambio catiónico tiene una conductividad de 80 mS/cm a 120 mS/cm.
- 25 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición de inmunoglobulinas derivadas de plasma proporcionada en la etapa (A) se prepara mediante un método que incluye una etapa de precipitación con alcohol, en el que la etapa de precipitación con alcohol incluye la formación de precipitado seleccionado del grupo que consiste en un precipitado de fracción I, un precipitado de fracción II de Cohn, un precipitado de fracción II+III de Cohn, un precipitado de fracción I+II+III de Cohn, un precipitado G, un precipitado A de Kistler-Nitschmann y un precipitado de gammaglobulina de Kistler-Nitschmann.
- 30 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico,
- 35 en el que el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico incluye cromatografía de intercambio catiónico,
- en el que el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico incluye las etapas de:
- 40 (G) unir la inmunoglobulina G del segundo eluato de intercambio catiónico a un segundo material de intercambio catiónico en condiciones de disolución que comprenden un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 1 a 15 mS/cm;
- 45 (H) eluir la inmunoglobulina G unida del material de intercambio catiónico, en una tercera etapa de elución de intercambio catiónico, usando un tercer tampón de elución de intercambio catiónico que tiene un pH de 4,0 a 10,0 y una conductividad de 15,0 mS/cm a 300 mS/cm; y
- (I) recuperar un tercer eluato de intercambio catiónico que comprende inmunoglobulinas.
- 50 12. Método según la reivindicación 11, en el que el segundo material de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil, preferiblemente, una resina de intercambio catiónico de carboximetilo.
- 55 13. Método según la reivindicación 12, en el que el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico incluye cromatografía de intercambio aniónico, en el que el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico incluye las etapas de:
- (J) aplicar inmunoglobulina G a una columna de intercambio aniónico, en una etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico, en condiciones de disolución que comprenden un pH de 5,0 a 8,0 y una conductividad de 0,5 mS/cm a 5,0 mS/cm; y
- 60 (K) recuperar una fracción no retenida de la etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico (J), estando la fracción no retenida enriquecida en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide, inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas.
- 65

14. Método según la reivindicación 12, en el que el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico incluye cromatografía de intercambio aniónico, en el que el enriquecimiento de inmunoglobulina G en el segundo eluato de intercambio catiónico incluye las etapas de:
- 5 (J) aplicar inmunoglobulina G a una columna de intercambio aniónico, en una etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico, en condiciones de disolución que comprenden un pH de 5,0 a 8,0 y una conductividad de 0,5 mS/cm a 5,0 mS/cm; y
- 10 (K) recuperar una fracción no retenida de la etapa de fracción no retenida de intercambio aniónico (J), estando la fracción no retenida enriquecida en inmunoglobulinas anti-Hib, inmunoglobulinas anti-Hbs, inmunoglobulinas anti-PV1, inmunoglobulinas anti-VHA, inmunoglobulinas anti-CMV, inmunoglobulinas antitetánicas, inmunoglobulinas anti-parvo B19, inmunoglobulinas antidiftéricas, o una combinación de las mismas.
- 15 15. Método según la reivindicación 13 ó 14, en el que:
- (a) las condiciones de disolución usadas en la etapa (J) incluyen un pH de 6,0 a 7,0; o
- 20 (b) las condiciones de disolución usadas en la etapa (J) incluyen un pH de 6,2 a 6,6.
16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que las condiciones de disolución usadas en la etapa (J) incluyen una conductividad de 1 mS/cm a 4,5 mS/cm.
- 25 17. Método para preparar una preparación de inmunoglobulina enriquecida en inmunoglobulinas relacionadas con enfermedad cerebral, comprendiendo el método mezclar una primera composición de inmunoglobulina preparada mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 13, 15 y 16 con una segunda preparación de inmunoglobulina que no está enriquecida en inmunoglobulina relacionada con enfermedad cerebral:
- 30 (a) en una razón de desde 4:1 hasta 1:100;
- (b) en una razón de desde 4:1 hasta 1:1;
- 35 (c) en una razón de desde 1:1 hasta 1:100; o
- (d) en una razón de desde 1:1 hasta 1:10.
- 40 18. Composición de inmunoglobulina relacionada con enfermedad cerebral enriquecida en inmunoglobulinas anti-beta-amiloide, inmunoglobulinas anti-RAGE, inmunoglobulinas anti- $\alpha$ -sinucleína, otras inmunoglobulinas específicas para una proteína relacionada con enfermedad cerebral, o una combinación de las mismas, para su uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno cerebral, comprendiendo el método,
- 45 administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de inmunoglobulina relacionada con enfermedad cerebral a un sujeto que lo necesita,
- en la que la composición de inmunoglobulina relacionada con enfermedad cerebral se prepara mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 13 y 15 a 17; y
- 50 en la que la enfermedad o el trastorno cerebral se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, encefalopatía espongiiforme transmisible, enfermedad de Huntington, un prolactinoma, amiloidosis relacionada con diálisis, angiopatía amiloide cerebral, enfermedad de Pick y angiopatía amiloide cerebral de tipo islandés.
- 55 19. Composición de inmunoglobulina relacionada con enfermedad infecciosa enriquecida en inmunoglobulinas anti-Hib, inmunoglobulinas anti-Hbs, inmunoglobulinas anti-PV1, inmunoglobulinas anti-VHA, inmunoglobulinas anti-CMV, inmunoglobulinas antitetánicas, inmunoglobulinas anti-parvo B19, inmunoglobulinas antidiftéricas, o una combinación de las mismas, para su uso en un método para tratar una enfermedad infecciosa, comprendiendo el método,
- 60 administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de inmunoglobulina relacionada con enfermedad infecciosa a un sujeto que lo necesita,
- 65 en la que la composición de inmunoglobulina relacionada con enfermedad infecciosa se prepara mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12 y 14 a 16; y

en la que el agente de enfermedad infecciosa se selecciona del grupo que consiste en *Haemophilus influenzae* tipo B (Hib), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis A (VHA), poliovirus (PV), citomegalovirus (CMV), *Clostridium tetani* (tétanos), parvovirus B19 o *Corynebacterium diphtheriae* (difteria).

- 5 20. Composición de inmunoglobulina enriquecida en inmunoglobulinas relacionadas con enfermedad cerebral, preparándose la composición de inmunoglobulina mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 a 13 y 15 a 17, en la que la composición comprende una inmunoglobulina G anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral en un título que es al menos 3 veces mayor que el título de la inmunoglobulina G anti-proteína relacionada con enfermedad cerebral en una composición de IgG total preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar.
- 10
21. Composición de inmunoglobulina enriquecida en inmunoglobulinas relacionadas con enfermedad infecciosa, preparándose la composición de inmunoglobulinas mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12 y 14 a 16, en la que la composición comprende una inmunoglobulina G anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa en un título que es al menos 3 veces mayor que el título de la inmunoglobulina G anti-agente relacionado con enfermedad infecciosa en una composición de IgG total preparada a partir de la sangre/plasma de más de mil individuos al azar.
- 15



**Figura 1**

IgG anti-fibrillas de A $\beta$ 40 medidas usando PBS

N.º de lote	Fracción de eluato (E)				Fracción de lavado 2M (2M)				Razón 2M/E
	Fibrillas	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	Fibrillas	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	
LE12H252Z	0.473	0.078	0.16	0.453	1.922	0.591	0.31	1.843	4.1
LE12H253Z	0.601	0.087	0.17	0.498	2.039	0.875	0.43	1.874	3.8
LE12H254Z	0.934	0.171	0.18	0.919	1.906	1.266	0.66	1.309	1.4
LE12H255Z	0.743	0.103	0.16	0.706	1.106	0.227	0.20	1.530	2.2
LE12H256Z	0.868	0.148	0.17	0.914	2.078	1.297	0.62	1.289	1.4
LE12H302Z	0.669	0.147	0.22	0.323	1.704	0.914	0.54	1.363	4.2
LE12H303Z	0.576	0.167	0.29	0.482	1.212	0.397	0.32	0.981	2.0
LE12H304Z	0.357	0.151	0.42	0.243	1.148	0.379	0.33	1.022	4.2
<b>Media</b>	<b>0.652</b>	<b>0.131</b>	<b>0.22</b>	<b>0.567</b>	<b>1.639</b>	<b>0.741</b>	<b>0.43</b>	<b>1.401</b>	<b>2.5</b>

Figura 2A

IgG anti-fibrillas de A $\beta$  medidas usando el tampón de fuerza iónica baja

N.º de lote	Fracción de eluato (E)				Fracción de lavado (2M)				Razón 2M/E
	Fibrillas	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	Fibrillas	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	
LE12H252Z	0.296	0.007	0.02	0.844	1.794	0.023	0.01	4.226	5.0
LE12H253Z	0.233	0.010	0.04	0.545	1.787	0.029	0.02	4.331	8.0
LE12H254Z	0.335	0.007	0.02	1.060	1.717	0.019	0.01	4.031	3.8
LE12H255Z	0.269	0.007	0.03	0.881	1.717	0.022	0.01	4.268	4.8
LE12H256Z	0.401	0.004	0.01	1.202	1.673	0.017	0.01	4.003	3.3
LE12H302Z	0.323	0.012	0.04	1.003	1.532	0.029	0.02	3.428	3.4
LE12H303Z	0.351	0.014	0.04	0.817	1.566	0.030	0.02	4.154	5.1
LE12H304Z	0.252	0.013	0.05	0.579	1.817	0.048	0.03	3.386	5.9
<b>Media</b>	<b>0.308</b>	<b>0.009</b>	<b>0.03</b>	<b>0.866</b>	<b>1.700</b>	<b>0.027</b>	<b>0.02</b>	<b>3.978</b>	<b>4.6</b>

Figura 2B

### Concentraciones de IgG anti-fibrillas de A $\beta$

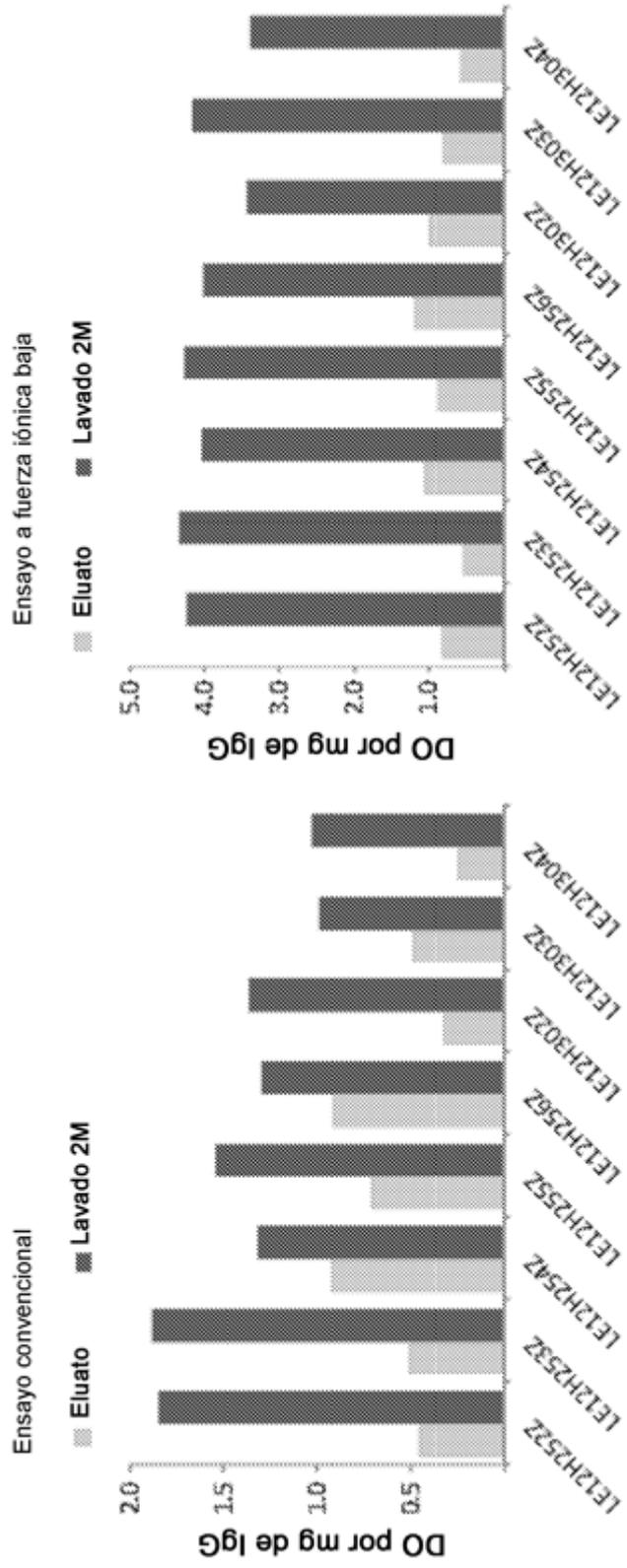


Figura 3A

Figura 3B

**IgG anti-CAPS de A $\beta$  40 medidas usando PBS**

N.º de lote	Fracción de eluato (E)				Fracción de lavado 2M (2M)				Razón 2M/E
	CAPS	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	CAPS	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	
LE12H252Z	1.107	0.075	0.07	0.632	2.000	1.192	0.60	1.378	2.2
LE12H253Z	1.086	0.095	0.09	1.132	1.901	1.478	0.78	2.309	2.0
LE12H254Z	1.418	0.189	0.13	0.683	2.117	1.271	0.60	1.565	2.3
LE12H255Z	1.324	0.112	0.08	0.800	1.537	0.267	0.17	1.596	2.0
LE12H256Z	1.133	0.100	0.09	0.670	1.825	0.508	0.28	1.907	2.9
LE12H302Z	0.917	0.160	0.17	0.928	2.078	0.943	0.45	1.888	2.0
LE12H303Z	1.061	0.174	0.16	0.870	1.680	0.361	0.21	1.720	2.0
LE12H304Z	0.802	0.133	0.17	0.850	1.425	0.337	0.24	1.524	1.8
<b>Media</b>	<b>1.106</b>	<b>0.130</b>	<b>0.12</b>	<b>0.821</b>	<b>1.820</b>	<b>0.795</b>	<b>0.42</b>	<b>1.736</b>	<b>2.1</b>

Figura 4A

**IgG anti-CAPS de A $\beta$  40 medidas usando el tampón de fuerza iónica baja**

N.º de lote	Fracción de eluato (E)				Fracción de lavado 2M (2M)				Razón 2M/E
	A $\beta$ 40	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	A $\beta$ 40	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	
LE12H252Z	0.489	0.009	0.02	1.252	1.848	0.022	0.01	3.996	3.2
LE12H253Z	0.424	0.014	0.03	1.450	1.816	0.027	0.02	4.587	3.2
LE12H254Z	0.601	0.005	0.01	1.876	1.752	0.019	0.01	3.343	1.8
LE12H255Z	0.437	0.009	0.02	1.408	1.739	0.026	0.02	4.506	3.2
LE12H256Z	0.529	0.004	0.01	1.389	1.800	0.029	0.02	3.437	2.5
LE12H302Z	0.596	0.012	0.02	1.588	2.169	0.024	0.01	6.159	3.9
LE12H303Z	0.579	0.021	0.04	1.579	2.049	0.022	0.01	6.886	4.4
LE12H304Z	0.471	0.011	0.02	1.492	2.270	0.034	0.02	4.114	2.8
<b>Media</b>	<b>0.516</b>	<b>0.011</b>	<b>0.02</b>	<b>1.504</b>	<b>1.930</b>	<b>0.025</b>	<b>0.02</b>	<b>4.629</b>	<b>3.1</b>

Figura 4B

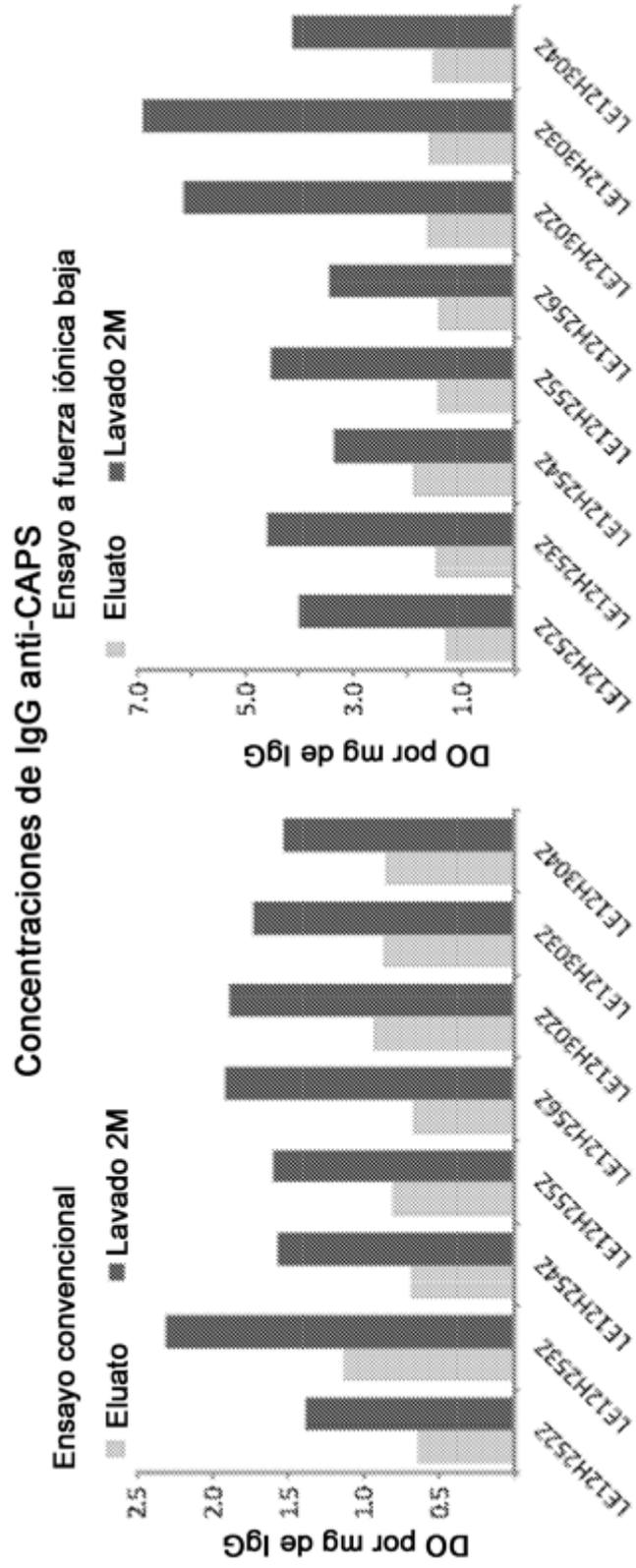


Figura 5B

Figura 5A

IgG anti-monómeros de A $\beta$ 42 medidas usando PBS

N.º de lote	Fracción de eluato (E)				Fracción de lavado 2M (2M)				Razón 2M/E
	A $\beta$ 42	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	A $\beta$ 42	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	
LE12H252Z	0.525	0.055	0.10	0.548	1.853	0.719	0.39	1.619	3.0
LE12H253Z	0.907	0.073	0.08	1.002	1.972	0.923	0.47	2.164	2.2
LE12H254Z	1.069	0.127	0.12	0.967	1.828	1.007	0.55	1.275	1.3
LE12H255Z	1.020	0.078	0.08	1.069	0.825	0.148	0.18	2.466	2.3
LE12H256Z	1.289	0.105	0.08	1.565	1.887	0.878	0.47	1.403	0.9
LE12H302Z	0.782	0.156	0.20	0.782	1.634	0.582	0.36	1.530	2.0
LE12H303Z	1.030	0.149	0.14	1.069	1.197	0.327	0.27	1.210	1.1
LE12H304Z	0.695	0.151	0.22	0.673	1.200	0.415	0.35	1.333	2.0
<b>Media</b>	<b>0.914</b>	<b>0.112</b>	<b>0.13</b>	<b>0.959</b>	<b>1.549</b>	<b>0.625</b>	<b>0.38</b>	<b>1.625</b>	<b>1.7</b>

Figura 6A

IgG anti-monómeros de A $\beta$ 42 medidas usando el tampón de fuerza iónica baja

N.º de lote	Fracción de eluato (E)				Fracción de lavado 2M (2M)				Razón 2M/E
	A $\beta$ 42	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	A $\beta$ 42	Blanco	Blanco/A $\beta$	DO/mg	
LE12H252Z	0.359	0.033	0.09	1.043	1.385	0.014	0.01	3.890	3.7
LE12H253Z	0.288	0.013	0.05	0.658	1.450	0.023	0.02	3.699	5.6
LE12H254Z	0.334	0.004	0.01	0.809	1.604	0.020	0.01	3.891	4.8
LE12H255Z	0.237	0.010	0.04	0.530	1.602	0.021	0.01	4.123	7.8
LE12H256Z	0.291	0.004	0.01	0.776	1.746	0.029	0.02	4.057	5.2
LE12H302Z	0.398	0.012	0.03	1.177	1.453	0.030	0.02	3.301	2.8
LE12H303Z	0.460	0.020	0.04	1.611	1.474	0.030	0.02	3.755	2.3
LE12H304Z	0.566	0.009	0.02	1.867	1.973	0.098	0.05	4.203	2.3
<b>Media</b>	<b>0.367</b>	<b>0.013</b>	<b>0.04</b>	<b>1.059</b>	<b>1.586</b>	<b>0.033</b>	<b>0.02</b>	<b>3.865</b>	<b>3.7</b>

Figura 6B

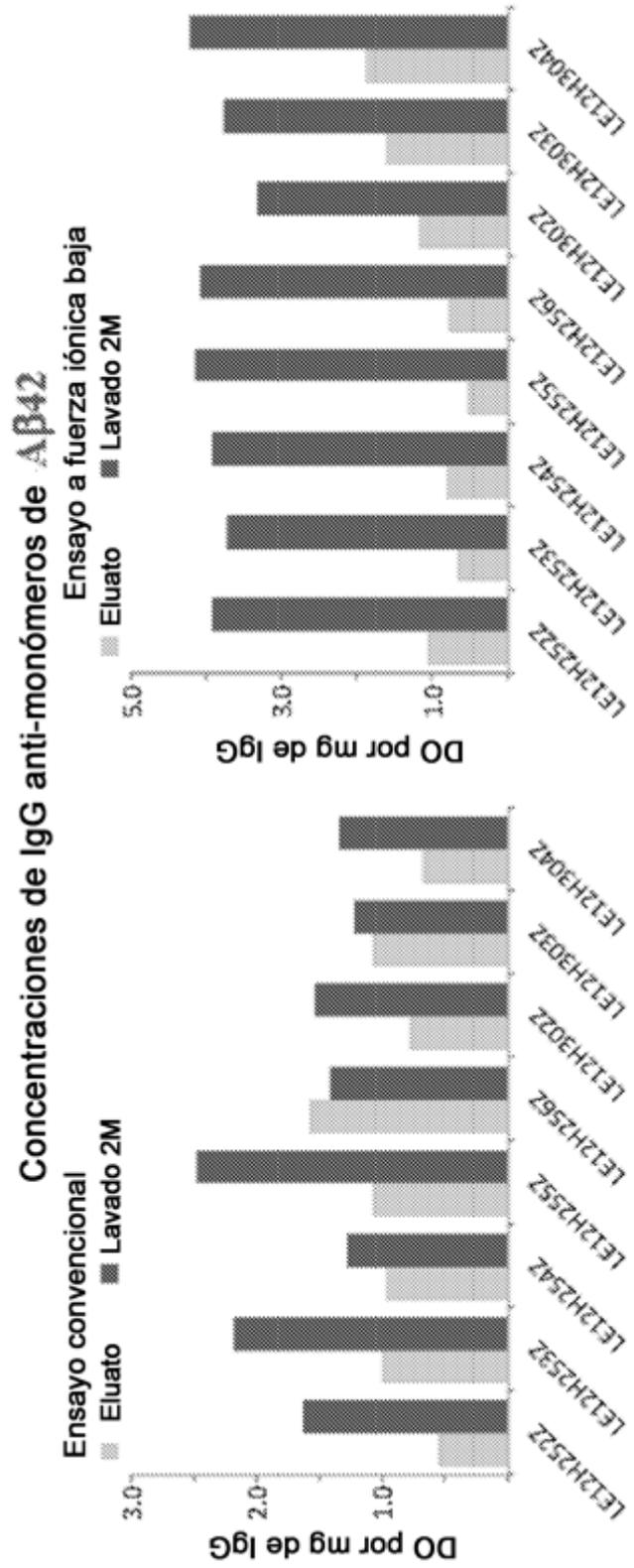
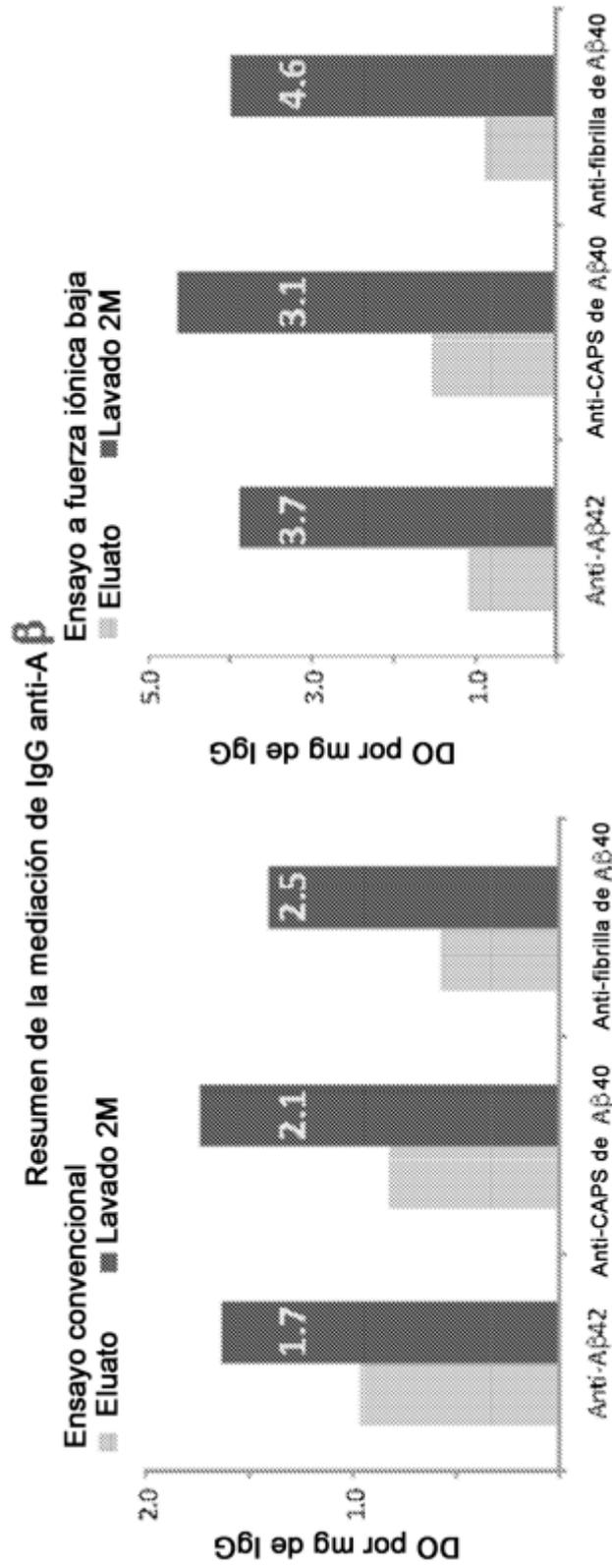


Figura B

Figura 7A



**Figura 8B**

**Figura 8A**

Distribución relativa de subclases de IgG

N.º de lote	Eluato				Fracción de lavado 2M			
	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
LE12H252Z	58.1	34.7	3.9	3.3	59.8	19.1	20.7	0.41
LE12H253Z	56.7	36.3	3.7	3.2	57.8	18.4	23.4	0.42
LE12H254Z	60.9	30.2	5.4	3.5	51.1	15.0	34.2	0.37
LE12H255Z	55.2	35.2	5.0	4.6	51.0	19.1	29.3	0.58
LE12H256Z	61.6	28.8	5.4	4.1	53.3	14.1	32.1	0.41
LE12H302Z	62.2	28.1	5.5	4.2	54.3	17.5	27.6	0.64
LE12H303Z	63.3	27.3	5.3	4.1	55.5	15.4	28.6	0.54
LE12H304Z	62.1	28.8	5.0	4.1	55.5	16.3	27.6	0.60
<b>Media</b>	60.0	31.2	4.9	3.9	54.8	16.9	28.0	0.5

Figura 9A

Distribución relativa de subclases de IgG

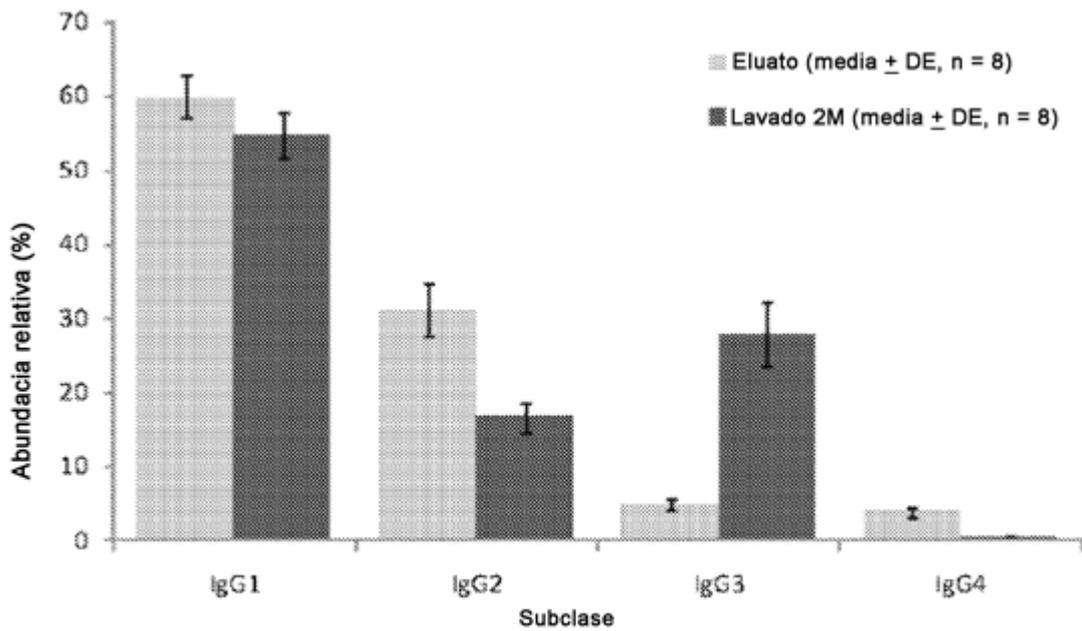


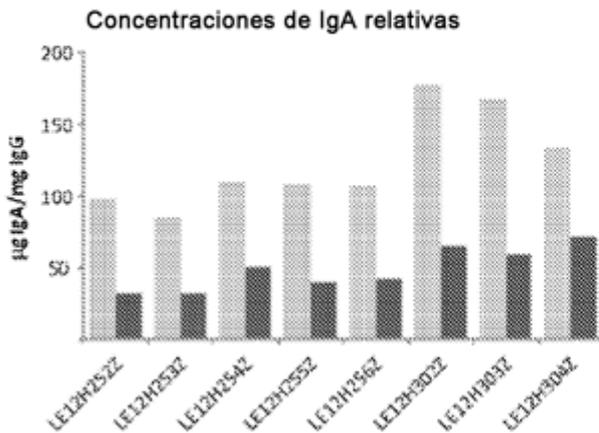
Figura 9B

**Concentraciones de IgA e IgM**

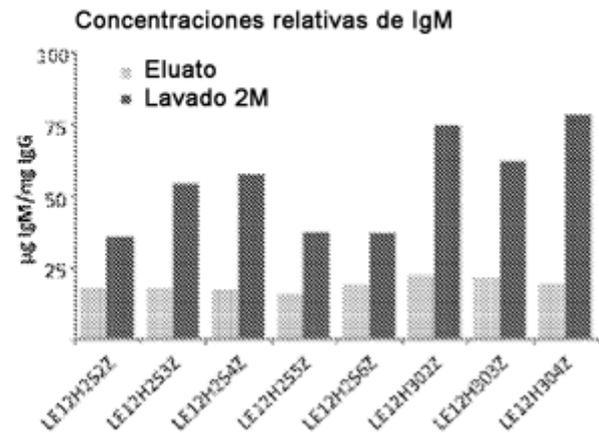
N.º de lote	Eluato					Fracción de lavado 2M				
	IgG mg/ml	IgA µg/ml	µg IgA/ mg IgG	IgM µg/ml	µg IgM/ mg IgG	IgG mg/ml	IgA µg/ml	µg IgA/ mg IgG	IgM µg/ml	µg IgM/ mg IgG
LE12H252Z	6.54	640	98	116	18	4.27	136	32	152	36
LE12H253Z	8.41	709	84	150	18	5.19	167	32	283	55
LE12H254Z	2.38	259	109	41	17	3.90	196	50	224	57
LE12H255Z	9.86	1060	108	156	16	2.00	80	40	75	37
LE12H256Z	9.12	970	106	174	19	4.44	185	42	165	37
LE12H302Z	9.74	1720	177	218	22	2.14	140	65	159	74
LE12H303Z	7.95	1320	166	172	22	3.77	222	59	233	62
LE12H304Z	10.3	1370	133	199	19	2.94	210	71	231	78
<b>Media</b>	<b>8.04</b>	<b>1006</b>	<b>123</b>	<b>153</b>	<b>19</b>	<b>3.58</b>	<b>167</b>	<b>49</b>	<b>190</b>	<b>55</b>

**Figura 10A**

**Concentraciones relativas de IgA e IgM**

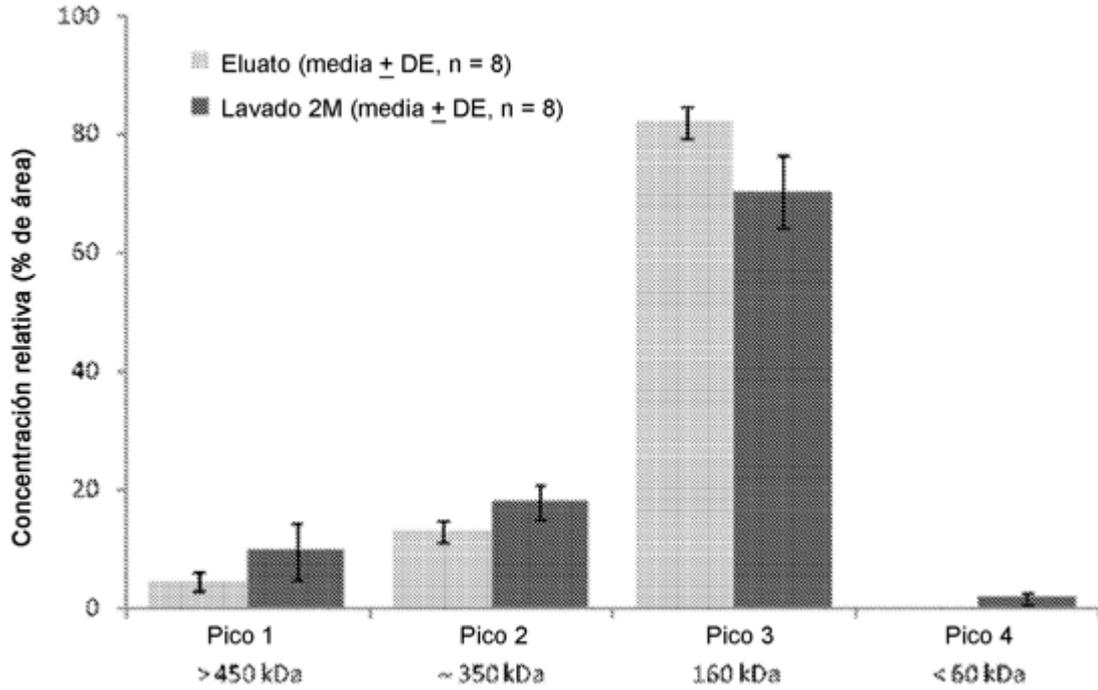


**Figura 10B**



**Figura 10C**

**Resultados del análisis mediante HP-SEC**



**Figura 11A**

**Análisis mediante HP-SEC**

N.º de lote	Eluato				Fracción de lavado 2M			
	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4
LE12H252Z	3.15	9.65	87.20	< 0.1	4.94	16.37	77.18	1.51
LE12H253Z	4.08	12.98	82.94	< 0.1	7.77	15.06	74.82	2.34
LE12H254Z	3.57	12.21	84.21	< 0.1	8.88	21.99	66.90	2.23
LE12H255Z	4.03	13.19	82.78	< 0.1	4.11	18.58	73.80	3.52
LE12H256Z	8.41	12.10	79.48	< 0.1	5.17	20.50	70.93	3.40
LE12H302Z	4.49	14.60	80.92	< 0.1	18.47	18.25	61.98	1.30
LE12H303Z	5.16	15.22	79.63	< 0.1	11.85	20.22	66.71	1.20
LE12H304Z	4.49	14.62	80.90	< 0.1	12.80	19.06	67.57	0.57
<b>Promedio</b>	<b>4.67</b>	<b>13.07</b>	<b>82.26</b>	<b>&lt; 0.1</b>	<b>9.24</b>	<b>18.75</b>	<b>69.99</b>	<b>2.01</b>

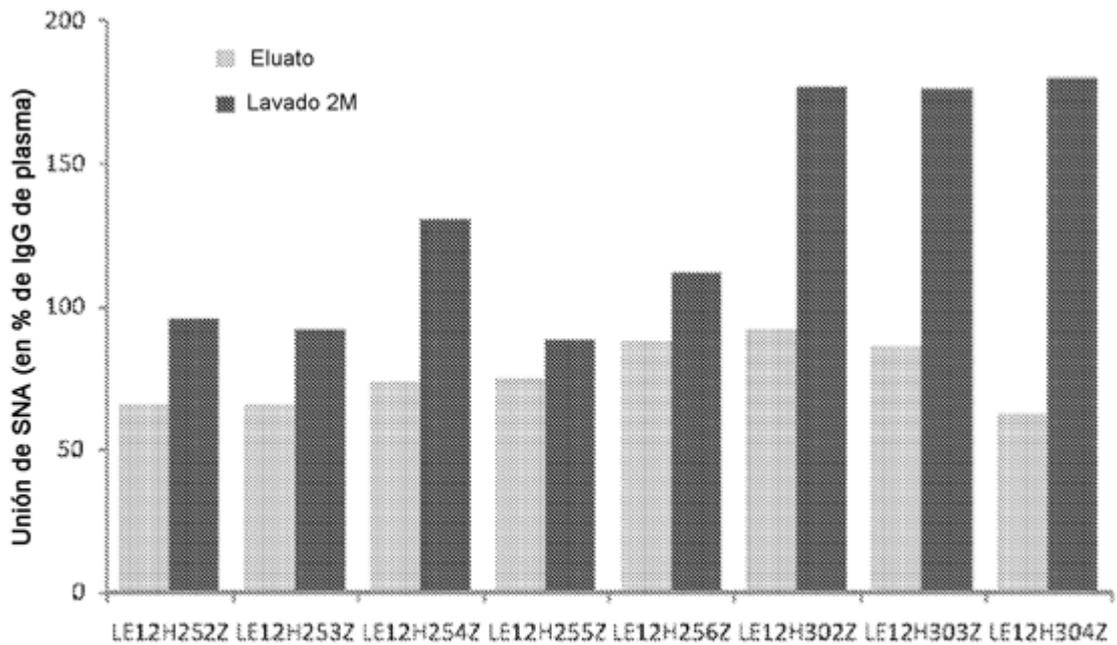
**Figura 11B**

**Unión a IgG-SNA**

N.º de lote	Eluato					Fracción de lavado 2M				
	[1]	[2]	[3]	Media	DER	[1]	[2]	[3]	Media	DER
LE12H252Z	64.3	64.1	67.2	<b>65.2</b>	2.7	93.2	98.2	96.0	<b>95.8</b>	2.6
LE12H253Z	63.2	67.1	69.1	<b>66.5</b>	4.5	89.1	89.4	93.4	<b>90.6</b>	2.6
LE12H254Z	70.2	76.8	82.0	<b>76.3</b>	7.7	125.4	127.2	121.5	<b>124.7</b>	2.3
LE12H255Z	77.5	71.5	83.3	<b>77.4</b>	7.6	89.3	89.6	88.9	<b>89.3</b>	0.4
LE12H256Z	94.4	81.0	93.5	<b>89.6</b>	8.4	107.5	105.8	104.6	<b>106.0</b>	1.4
LE12H302Z	<b>91.7</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<b>176.7</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LE12H303Z	<b>86.1</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<b>176.5</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
LE12H304Z	<b>62.2</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	<b>180.2</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

**Figura 12A**

**Unión de IgG a SNA**



**Figura 12B**

Resultados del análisis de N-glicanos totales

Estructura de N-glicano	LE12H2S2Z		LE12H2S4Z		LE12H2S5Z	
	Eluato	Lavado 2M	Eluato	Lavado 2M	Eluato	Lavado 2M
GnMF	3.1	4.0	3.5	2.5	4.7	3.1
AMF	3.3	3.8	3.6	3.5	4.0	3.6
GnGrF	11.3	9.0	10.8	7.4	10.4	7.6
AGn	1.8	2.0	1.5	1.9	2.0	1.2
AGnF	25.8	23.5	26.5	22.3	27.5	20.7
GnGrFbi	3.8	3.9	3.3	2.9	4.5	3.8
AAF	14.9	20.4	19.4	18.5	17.2	19.8
AGnFbi	9.0	8.6	7.3	5.8	6.7	8.3
NaGnF	4.6	2.3	2.4	3.9	2.6	2.2
NaA	1.4	2.5	1.7	2.6	1.6	2.3
AAFbi	2.2	1.5	1.9	2.4	2.0	2.0
NaAF	14.5	14.9	11.9	18.3	12.0	19.2
NaGnFbi	1.0	1.2	1.6	1.8	1.5	2.2
NaNa	0.7	2.0	1.2	4.0	0.9	2.1
NaAFbi	0.9	0.0	0.7	0.4	0.6	0.4
NaNaF	2.8	0.6	3.3	2.5	2.4	1.9
<b>N-glicanos neutros</b>	<b>76.4</b>	<b>79.1</b>	<b>79.6</b>	<b>69.6</b>	<b>80.6</b>	<b>72.4</b>
<b>N-glicanos monosialilados</b>	<b>20.1</b>	<b>18.3</b>	<b>15.9</b>	<b>23.9</b>	<b>16.0</b>	<b>23.6</b>
<b>N-glicanos disialilados</b>	<b>3.5</b>	<b>2.6</b>	<b>4.5</b>	<b>6.5</b>	<b>3.4</b>	<b>4.0</b>
<b>N-glicanos sialilados</b>	<b>23.6</b>	<b>20.9</b>	<b>20.4</b>	<b>30.4</b>	<b>19.4</b>	<b>27.6</b>

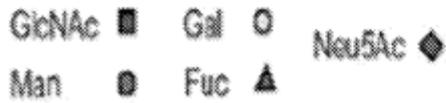
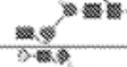
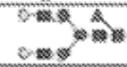
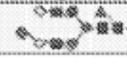


Figura 13

**Análisis de N-glicanos de Fc de IgG1**

Estructura de N-glicano		M/z	LE12H252Z		LE12H254Z		LE12H255Z	
			Eluato	Lavado 2M	Eluato	Lavado 2M	Eluato	Lavado 2M
MGnF		2431.4	6.3	6.0	6.5	5.8	5.6	5.0
MAF		2593.5	4.4	5.0	5.0	4.4	4.7	4.7
GnGnF		2634.7	15.7	12.4	14.0	10.8	13.5	11.3
AGn		2650.7	3.0	3.2	2.8	3.2	3.0	3.6
AGnF		2796.8	26.0	22.6	26.5	23.2	29.5	25.3
GnGnFbi		2837.8	4.4	4.0	3.5	3.5	3.7	3.6
AAF		2958.8	18.0	20.8	19.7	21.7	19.1	20.9
AGnFbi		2999.9	8.0	7.9	7.0	7.7	7.1	7.6
GnNaF		3087.9	1.9	1.9	1.8	1.8	1.9	2.0
AAFbi		3161.9	2.3	2.8	2.0	2.6	2.0	2.6
ANaF		3249.9	10.0	13.4	11.2	15.1	9.9	13.3
<b>N-glicanos de Fc de IgG1 sialilados</b>			<b>11.8</b>	<b>15.3</b>	<b>13.0</b>	<b>17.0</b>	<b>11.9</b>	<b>15.3</b>



**Figura 14**

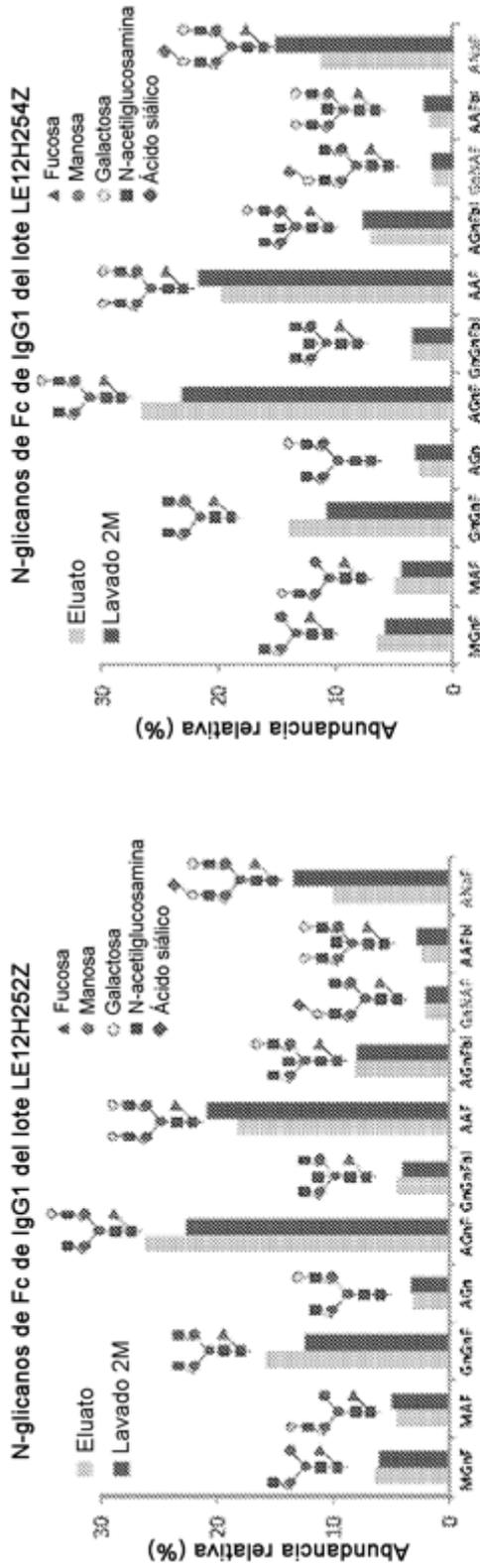


Figura 15B

Figura 15A

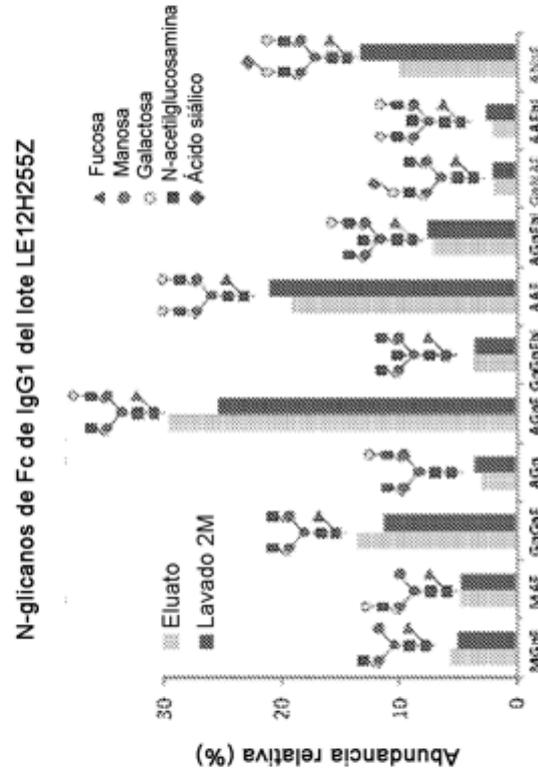


Figura 15C

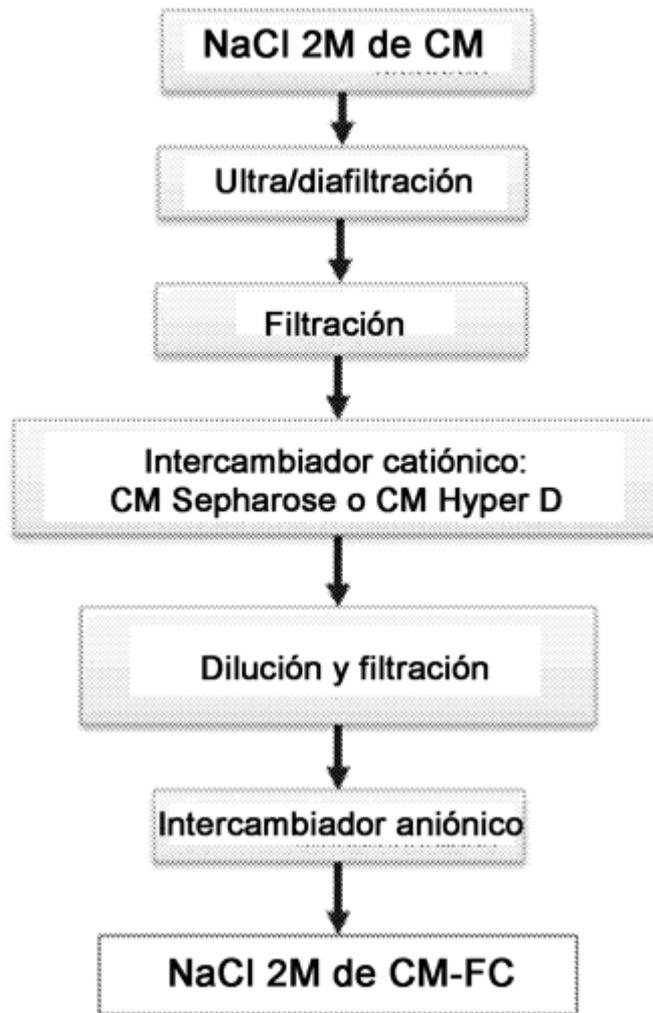


Figura 16

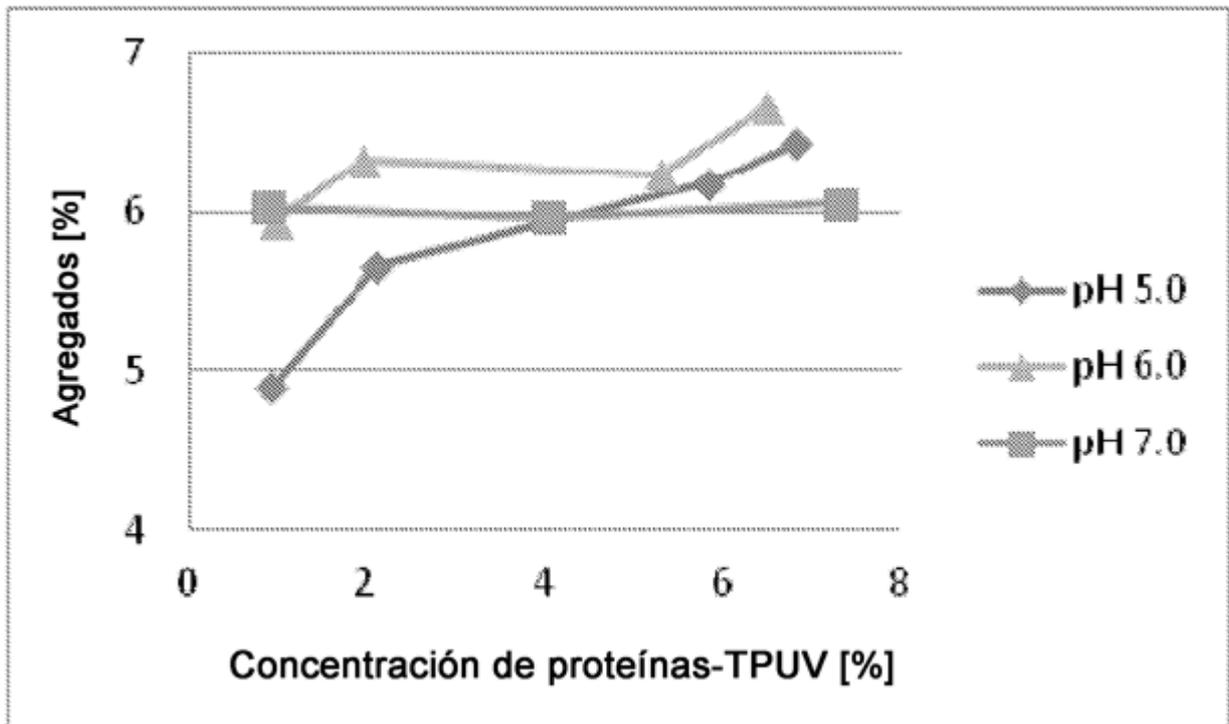


Figura 17A

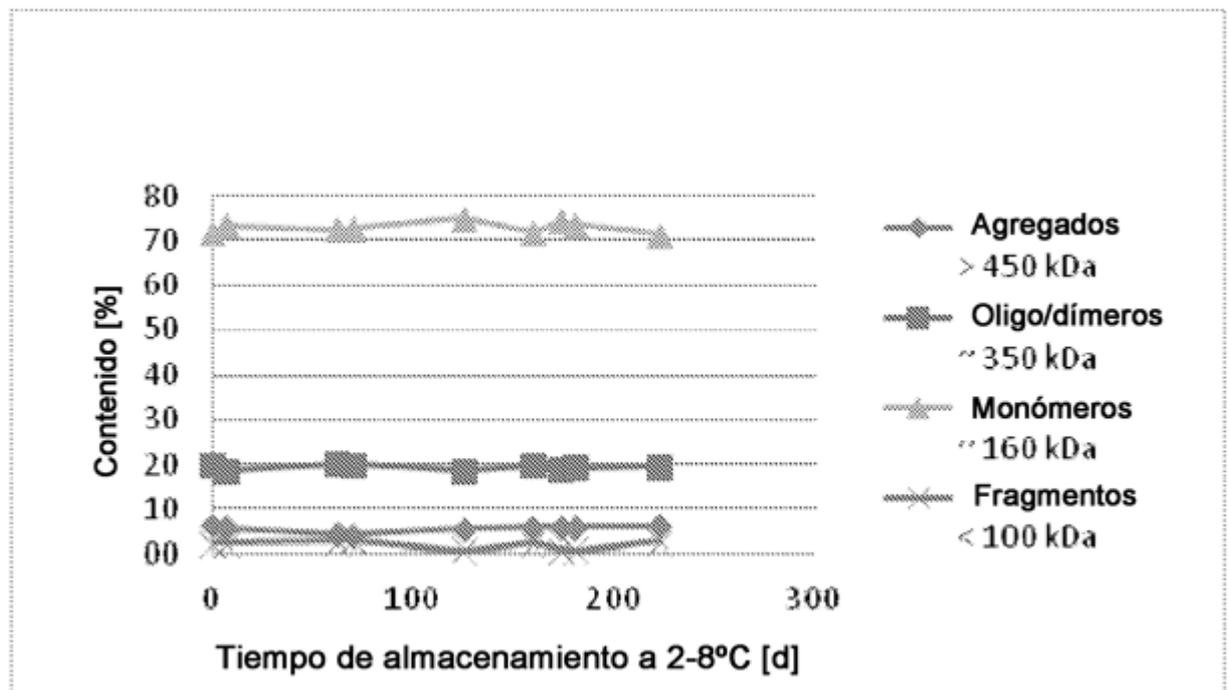


Figura 17B

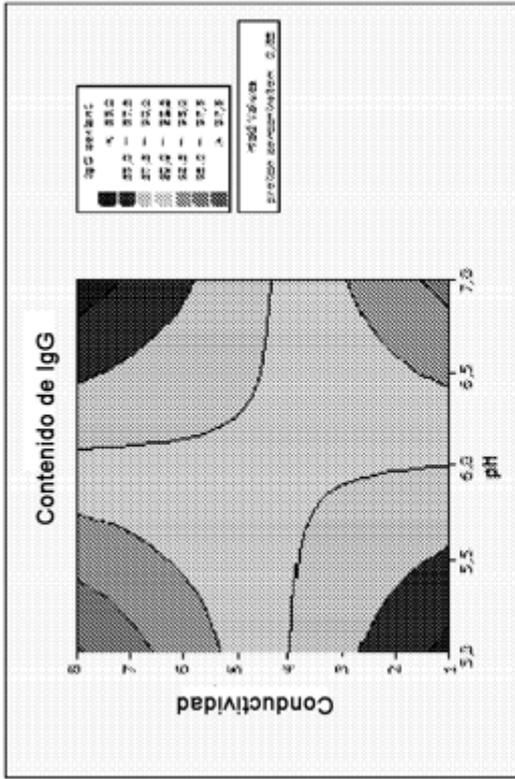


Figura 18B

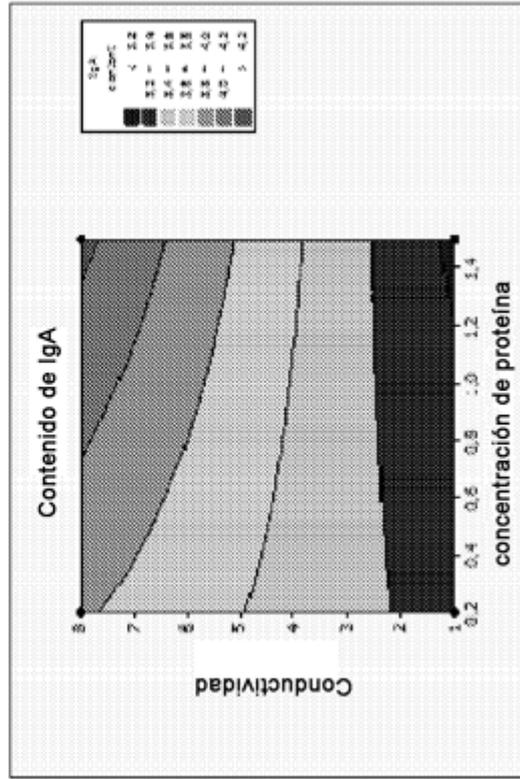


Figura 18D

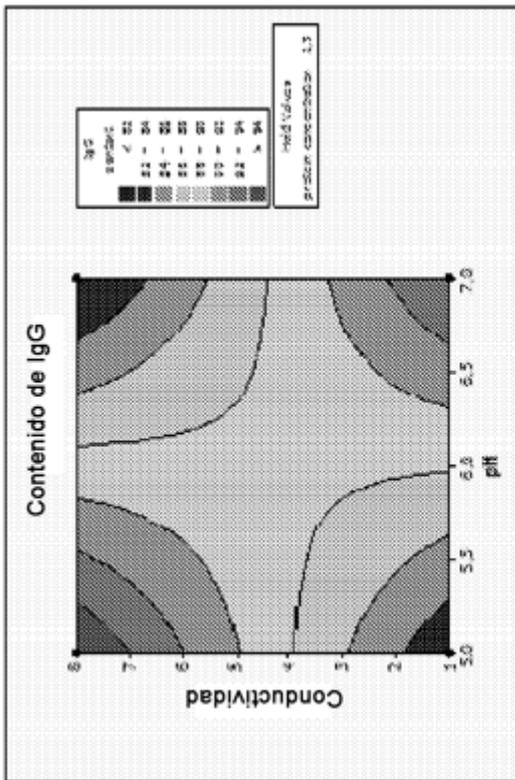


Figura 18A

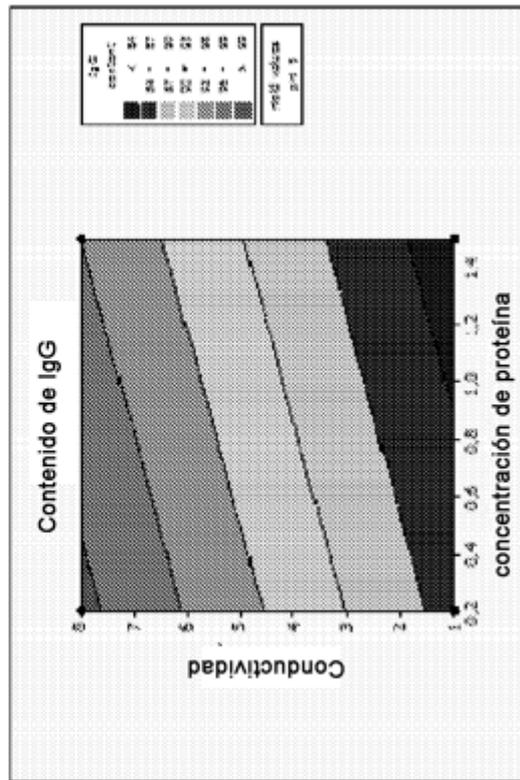


Figura 18C

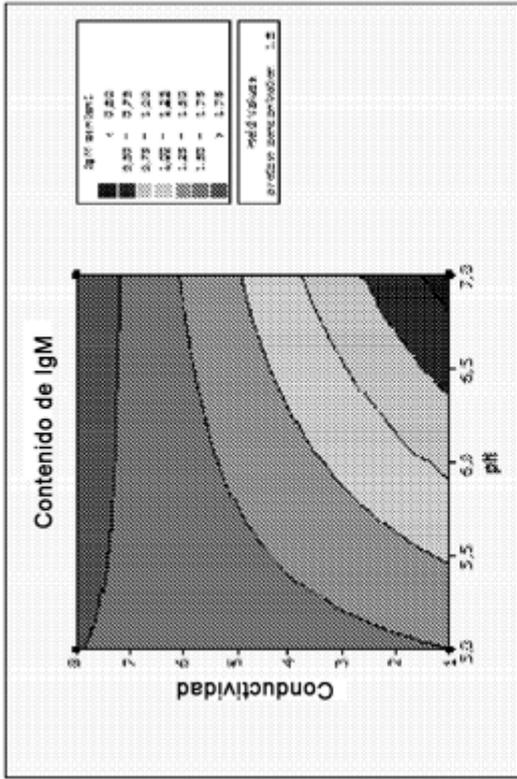


Figura 18F

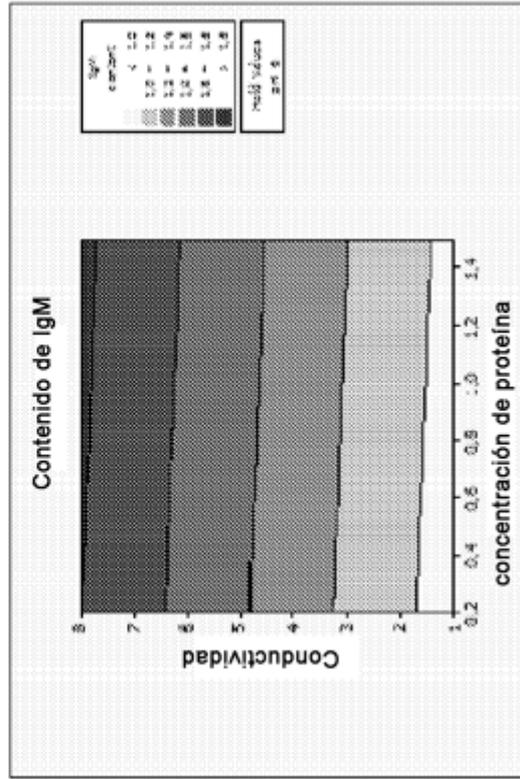


Figura 18H

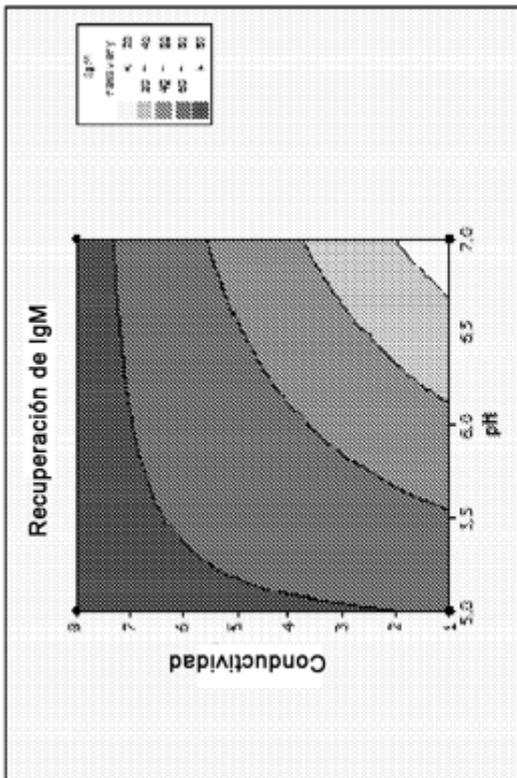


Figura 18E

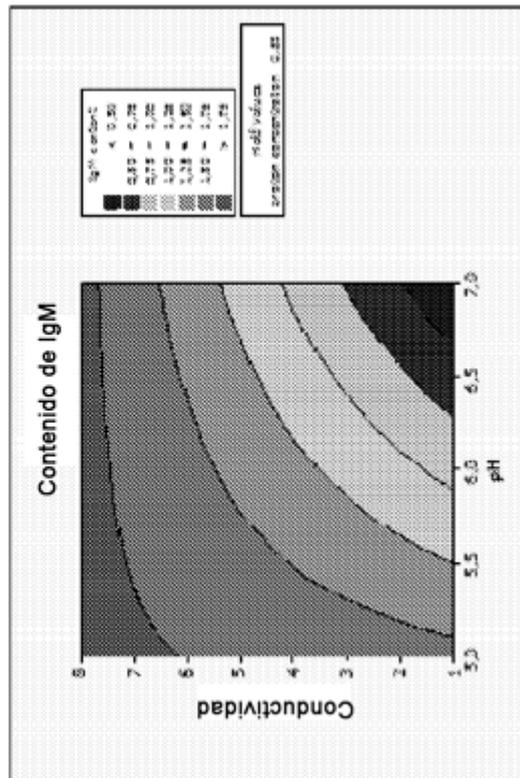


Figura 18G

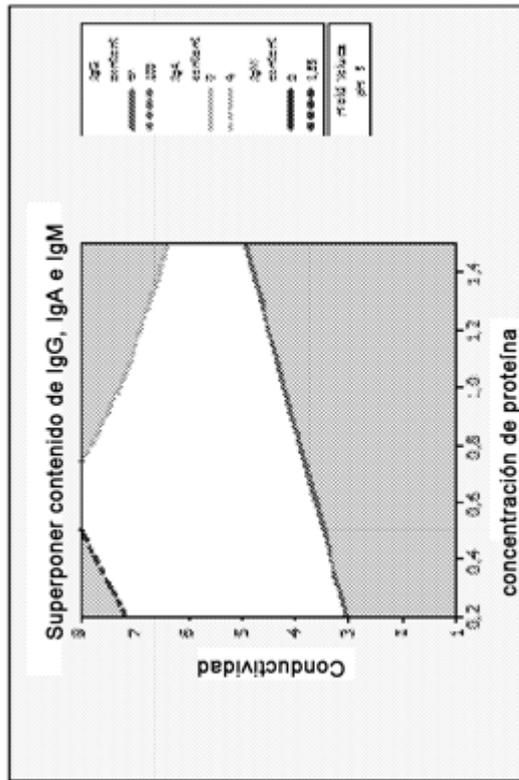


Figura 18J

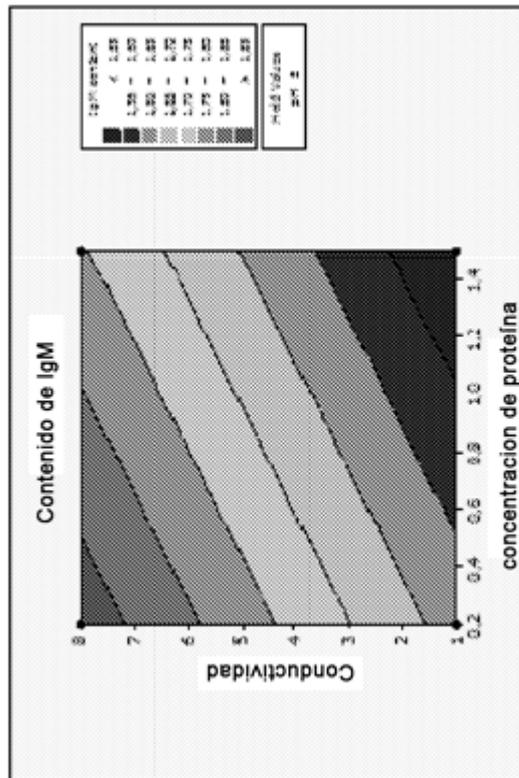


Figura 18I

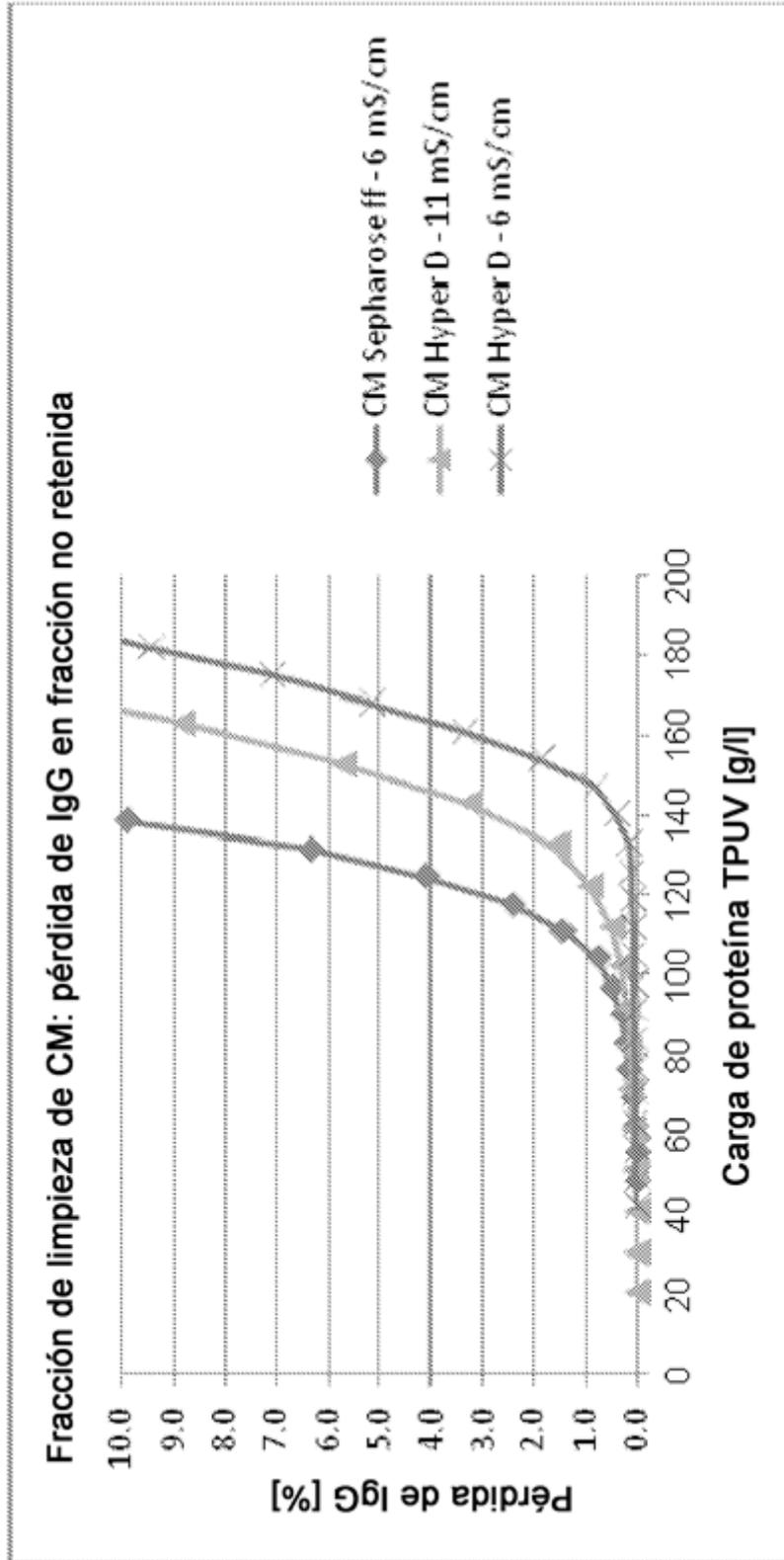


Figura 19

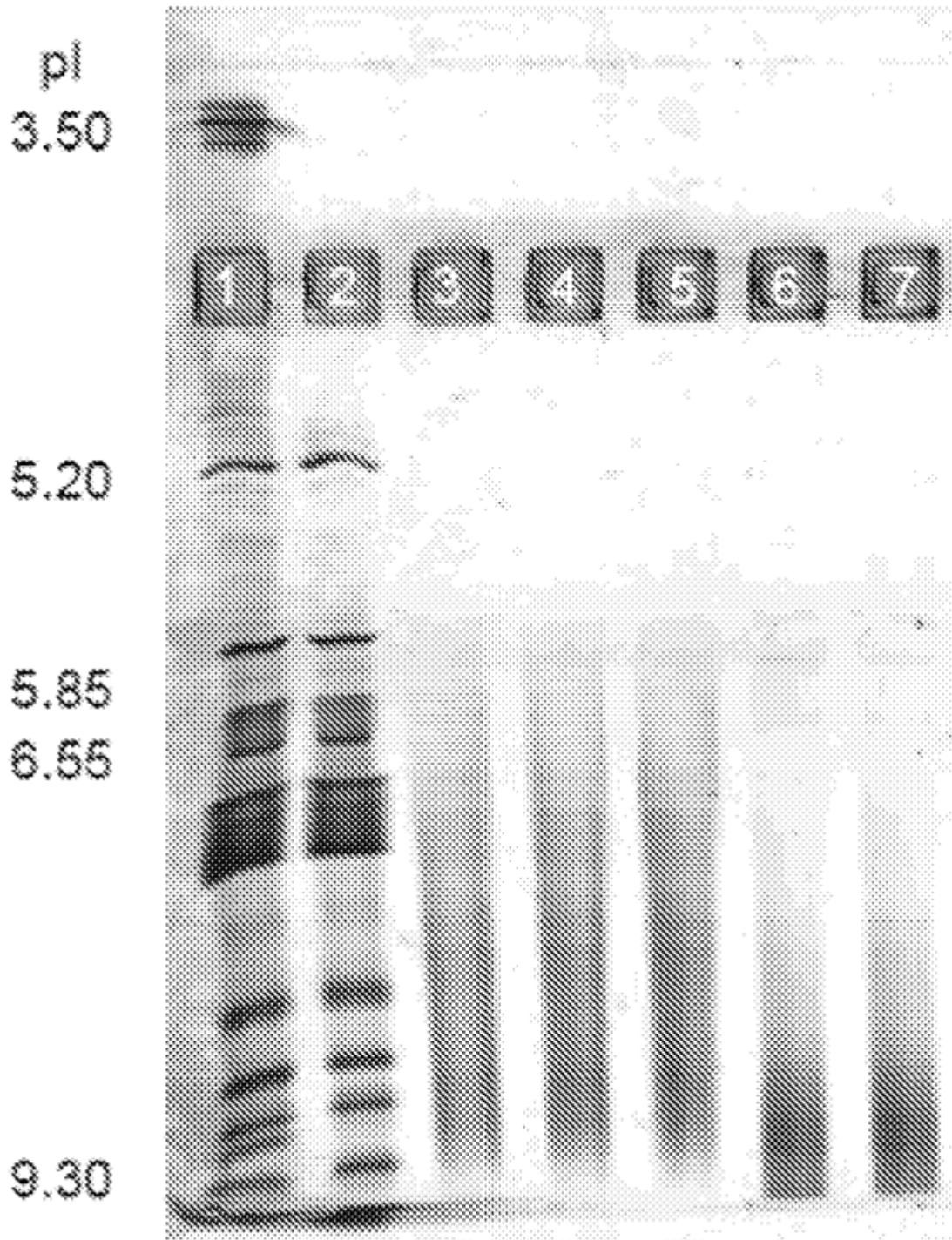


Figura 20

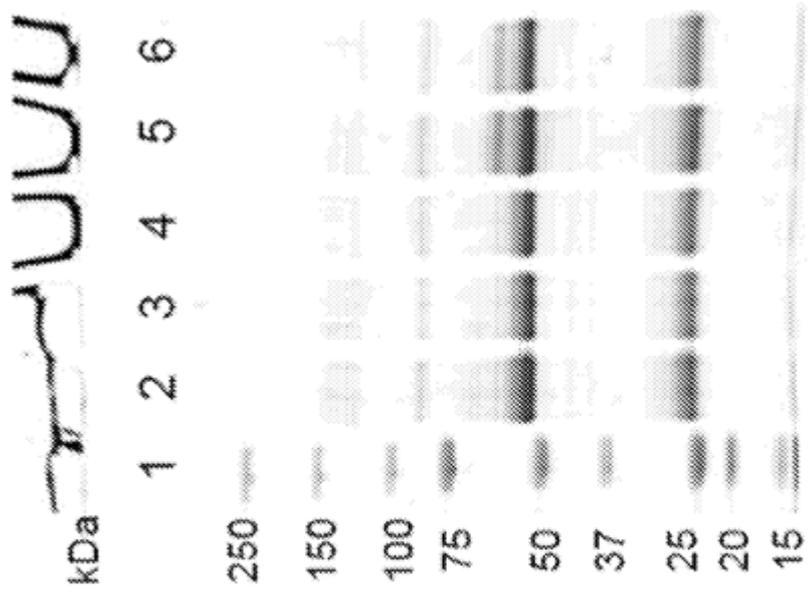


Figura 21B

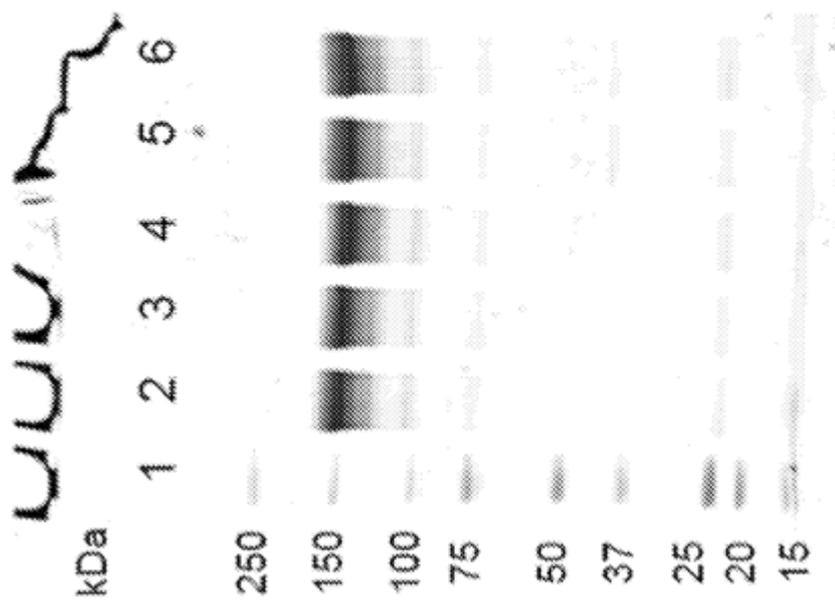


Figura 21A