

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 783**

51 Int. Cl.:

C07K 1/36 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/KR2014/002021**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15137531**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14885344 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3118210**

54 Título: **Procedimiento de purificación de inmunoglobulina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.06.2020

73 Titular/es:

**GREEN CROSS HOLDINGS CORPORATION
(100.0%)
107 Ihyeon-ro 30 beon-gil, Giheung-gu
Yongin-si, Gyeonggi-do 446-770, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, DONG-HWAN;
SON, KI-HWAN;
SEO, KANG YUN;
CHOI, SUNG MIN;
LEE, GUN SUL y
KIM, KI-YONG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkingen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 769 783 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de purificación de inmunoglobulina

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento para purificar una inmunoglobulina, y más particularmente, a un procedimiento para purificar una inmunoglobulina, que comprende: disolver la fracción I + II + III o la fracción II + III de proteína plasmática que contiene inmunoglobulina seguido por la realización de una reacción de precipitación mediante la adición de caprilato, realizar diálisis y concentración, y luego eliminar efectivamente un disolvente y detergente agregados para inactivar virus sometidos a procesos de purificación mediante resina de intercambio aniónico y resina cerámica de intercambio catiónico, y mantener la concentración salina a un nivel constante para mantener el contenido de polímero de inmunoglobulina a un nivel bajo.

15 **Estado de la técnica**

Las inmunoglobulinas que son proteínas plasmáticas que contienen anticuerpos contra diversos virus y bacterias se usan como fármacos para prevenir o tratar enfermedades mediante la administración a sujetos que naturalmente carecen de anticuerpos o pacientes que necesitan suplementos artificiales de anticuerpos debido a enfermedades virales o bacterianas.

Para usar tales inmunoglobulinas como fármacos, se han preparado inmunoglobulinas para inyección subcutánea o intramuscular de acuerdo con el proceso de fraccionamiento con etanol frío (Cohn E. et al., J. Am. Chem. Soc., 68: 459, 1946) desarrollado por Cohn y Oncley o el proceso modificado de fraccionamiento con etanol frío (Kistler P, Nitschmann HS, Vox Sang, 7: 414. 1952) desarrollado por Kistler y Nitschmann.

Sin embargo, las inmunoglobulinas para inyección intramuscular tienen los siguientes problemas: 1) las dosis de tales inmunoglobulinas son limitadas, lo que hace imposible administrar las inmunoglobulinas en grandes cantidades; 2) las inmunoglobulinas causan dolor en el sitio inyectado con las inmunoglobulinas; 3) las inmunoglobulinas tienen un bajo contenido de inmunoglobulina G natural (IgG) que tiene actividad de anticuerpo; 4) la actividad de anticuerpo de las inmunoglobulinas se reduce por la proteasa en el sitio inyectado; y 5) el tiempo necesario para alcanzar las concentraciones plasmáticas máximas es de 24 horas o más.

Para resolver los problemas de la inyección intramuscular, se intentó la administración de inmunoglobulinas por inyección intravenosa. Sin embargo, cuando las preparaciones de inmunoglobulina se administraron por vía intravenosa, una variedad de efectos secundarios inmediatos, incluyendo dificultad respiratoria y shock del sistema circulatorio, aparecieron debido a un efecto secundario grave (reacción anafiláctica) atribuible a los agregados con actividad anticomplementaria. Tales síntomas aparecieron principalmente en pacientes con deficiencia de inmunoglobulina. En particular, se observó un efecto secundario de hipersensibilidad grave en pacientes en los que aparecieron anticuerpos anti-IgA.

Por lo tanto, como la inyección intravenosa de inmunoglobulinas es imposible debido a los problemas descritos anteriormente, se ha requerido el desarrollo de preparaciones de inmunoglobulina para inyección intravenosa, y se han desarrollado procedimientos capaces de eliminar los agregados descritos anteriormente y/o prevenir la formación de agregados durante los procesos de preparación. La inyección intravenosa de inmunoglobulinas ha sido posible como resultado del tratamiento de inmunoglobulinas con proteasas como pepsina, papaína o plasmina, o sustancias químicas como la β -propiolactona, para cambiar su estructura y suprimir la formación de agregados de inmunoglobulina o destruir agregados de inmunoglobulina, reduciendo así las actividades anticomplementarias de las inmunoglobulinas.

Los productos de inmunoglobulina intravenosa de primera generación (IVIG) se prepararon tratando un material de partida (fracción II de Cohn) con pepsina para eliminar los agregados de inmunoglobulina. El proceso de preparación no comprendía una etapa de cromatografía en columna, y el producto preparado se liofilizó para mantenerlo establemente durante un período de tiempo adecuado, y se disolvió inmediatamente antes de su uso. Sin embargo, se descubrió que los productos de IVIG fabricados por algunos fabricantes causaron infecciones virales como la hepatitis C viral. Por esta razón, se agregaron al proceso de preparación una o más etapas para inactivar y/o eliminar virus conocidos. Posteriormente, los productos de IVIG de segunda generación con baja actividad anticomplementaria y mayor estabilidad se divulgaron a mediados de la década de 1980, y los productos de IVIG se purificaron mediante varias etapas de cromatografía.

Dichas preparaciones se inyectaron por vía intravenosa y, por lo tanto, superaron las desventajas de las inmunoglobulinas intramusculares, incluyendo dosis limitadas, dolor en el sitio inyectado y la reducción en la actividad de anticuerpos de las inmunoglobulinas por la proteasa, y el tiempo necesario para alcanzar las concentraciones plasmáticas máximas también fue reducido a varias horas o menos.

65

Sin embargo, los productos de inmunoglobulina intravenosa como los descritos anteriormente tienen poca o ninguna IgG natural con actividad de anticuerpo debido a su cambio estructural, y por lo tanto tienen una capacidad reducida o nula de unión al complemento y también tienen una vida media en sangre tan corta como aproximadamente 4 - 12 días, lo que sugiere que no exhiben efectos satisfactorios en la prevención y el tratamiento de enfermedades. Además, los productos de IVIG de primera y segunda generación preparados en forma de polvo liofilizado requieren un proceso adicional para disolverlos, y tienen bajas tasas de disolución. Por esta razón, se han desarrollado productos de IVIG líquidos y se han requerido procesos mejorados para obtener productos de IVIG más estables y puros.

En relación con esto, la patente alemana No. 2.604.759 y la patente estadounidense No. 4.124.576 divulgan procedimientos para obtener IgG pura (IVIG de tercera generación) con actividad de anticuerpos usando un tensioactivo no iónico tal como polietilenglicol, a diferencia de la inmunoglobulina gamma descrita anteriormente para inyección intravenosa. Dichas preparaciones de IgG tienen una capacidad de unión al complemento y una mayor vida media en la sangre, y por lo tanto pueden mostrar buenos efectos en la prevención y el tratamiento de enfermedades. Sin embargo, estas preparaciones producidas por el tratamiento con polietilenglicol todavía pueden causar efectos secundarios, ya que es difícil eliminar por completo los agregados con actividad anticomplementaria de estas preparaciones (que muestran una actividad anticomplementaria de aproximadamente 0,02 U/mg).

Además, la publicación coreana abierta a inspección pública No 1983-0007083 divulga un procedimiento para preparar una inmunoglobulina intravenosa a partir de la fracción II o la fracción II + III de Cohn, aislada del plasma humano, mediante tratamiento con polietilenglicol. Sin embargo, subsisten problemas ya que el proceso es complicado y el rendimiento es bajo.

El documento US 2007/0173638 divulga un procedimiento para elaborar una preparación de anticuerpo purificada, inactivada para virus y segura contra virus a partir de una solución inicial que comprende anticuerpos y contaminantes, el procedimiento comprende las etapas de: (a) ajustar el pH de la solución inicial de aproximadamente 4,6 hasta aproximadamente 4,95 en particular de aproximadamente 4,8 hasta aproximadamente 4,95 para producir una solución intermedia; (b) añadir iones de caprilato y/o heptanoato a la solución intermedia y mantener el pH de aproximadamente 4,6 hasta aproximadamente 4,95, en particular pH de aproximadamente 4,8 hasta aproximadamente 4,95, por lo que se forma un precipitado y los anticuerpos están esencialmente presentes en el sobrenadante; (c) incubar la solución sobrenadante en condiciones de concentración de iones de caprilato y/o heptanoato, tiempo, pH y temperatura, opcionalmente concentrando y diafiltrando la solución filtrada antes del ajuste del pH; (d) aplicar la solución filtrada con al menos una resina de intercambio aniónico y opcionalmente con dos resinas de intercambio aniónico diferentes en condiciones que permitan la unión de contaminantes a la resina sin permitir una unión significativa de los anticuerpos a la resina, en la que se produce una preparación de anticuerpos inactivada para virus y segura contra virus.

Por consiguiente, los presentes inventores han realizado grandes esfuerzos para resolver los problemas descritos anteriormente que se producen en la técnica anterior y, como resultado, han encontrado que, cuando una inmunoglobulina se purifica de la fracción I + II + III o la fracción II + III de proteína plasmática que contiene inmunoglobulina como material de partida por precipitación con caprilato de sodio, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico, pueden resolverse problemas, incluido un proceso complicado y un bajo rendimiento, que se producen en procedimientos de preparación convencionales que emplean tratamiento con polietilenglicol, y se puede omitir una etapa de precipitación I + III para preparar la fracción II y se puede omitir una etapa de precipitación II para que se pueda realizar fácilmente un proceso para producir una preparación de inmunoglobulina intravenosa, completando de esta manera la presente invención.

Divulgación de la invención

Problema técnico

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para purificar inmunoglobulinas, que pueda eliminar eficazmente impurezas y sustancias trombóticas para producir una inmunoglobulina estable y de alta pureza.

Solución técnica

Para lograr el objetivo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento para purificar una inmunoglobulina, que comprende las etapas de:

(a) disolver la fracción I + II + III o fracción II + III de proteína plasmática que contiene inmunoglobulina, seguido de la realización de una reacción de precipitación añadiendo ácido caprílico;

(b) eliminar un precipitado producido a partir de (a), seguido por la filtración de un sobrenadante que comprende inmunoglobulina, concentrar un filtrado, someter un concentrado a cromatografía de intercambio aniónico y recuperar una fracción no unida a la columna de la cromatografía de intercambio aniónico;

(c) tratar la fracción recuperada con un disolvente/detergente para inactivar virus, seguido por el sometimiento de la fracción a cromatografía de intercambio catiónico para eliminar el disolvente/detergente, en la que la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo usando una resina de intercambio catiónico a base de cerámica,

5 en la que la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a una concentración salina de 400-600 mM;

(d) dializar y/o concentrar un eluato obtenido de la cromatografía de intercambio catiónico, sometiendo el eluato a cromatografía de intercambio aniónico y recuperar una fracción no unida a la columna de la cromatografía de intercambio aniónico, en la que una concentración salina del eluato obtenido a partir de la columna de cromatografía de intercambio catiónico en la etapa (c) se mantiene a 50-150 mM para mantener el contenido de polímeros durante la diálisis y/o concentración; y

10

(e) filtrar la fracción recuperada a través de un filtro de virus y dializar y/o concentrar el filtrado, obteniendo así una inmunoglobulina purificada.

15

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista esquemática que muestra un proceso para preparar una inmunoglobulina intravenosa de acuerdo con la presente invención.

20 La Figura 2 muestra los resultados de medir la pureza (trombina/IgG) de una inmunoglobulina en cada etapa de preparación.

La Figura 3 muestra los resultados de medir la concentración de FXI (factor de coagulación humano XI) contenido en un filtrado o precipitado en cada etapa de preparación mediante SDS-PAGE.

25 Mejor modo para realizar la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia al que pertenece la invención. Generalmente, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos experimentales, que se describirán a continuación, son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

30

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína plasmática que contiene inmunoglobulina" pretende abarcar plasma libre de crioprecipitado obtenido mediante la eliminación de diversas proteínas plasmáticas tales como el Factor IX y antitrombina del plasma humano o plasma placentario humano, diversas fracciones de Cohn y fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio o PEG (Poison et al., Biochem Biophys Acta, 82: 463, 1964); Polson y Ruiz-Bravo, Vox Sang, 23: 107, 1972). Preferiblemente, la fracción de proteína plasmática que se usa en la presente invención puede ser la fracción II de Cohn, la fracción I + II + III de Cohn o la fracción II + III de Cohn.

35

En la presente invención, se usó la fracción I + II + III o la fracción II + III obtenida de plasma humano de acuerdo con un procedimiento convencional de fracción de plasma de Cohn. Se realizó un proceso de purificación posterior para eliminar diversas lipoproteínas, fibrinógenos, α -globulina, β -globulina y diversos factores de coagulación de la fracción I + II + III o la fracción II + III.

40

En la presente invención, el plasma humano utilizado fue plasma estadounidense aprobado por la FDA sometido a Biotests, incluyendo pruebas de amplificación de ácido nucleico en virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis C (VHC), virus de hepatitis B (VHB) y parvovirus B19, y pruebas serológicas. El plasma almacenado a -20 °C o menos se descongeló por incubación en un recipiente encamisado a 1 a 6 °C durante 12-72 horas.

45

Mientras que el plasma se descongeló en las condiciones descritas anteriormente, se produjo un crioprecipitado que incluía fibrinógeno y factores de coagulación. El crioprecipitado producido se eliminó por centrifugación, y se recuperó el resto del plasma desprovisto de crioprecipitado. Luego, se repitieron los procesos de precipitación y filtración, obteniendo de esta manera la fracción I + II + III.

50

En el proceso de filtración para aislar plasma que contiene inmunoglobulina, se añadió un coadyuvante de filtración y se mezcló con el plasma desprovisto de crioprecipitado que luego se separó en un sobrenadante y un precipitado por medio de un filtro prensa. Como filtro auxiliar, se utilizó Celpure 300 o Celpure 1000.

55

En el procedimiento de la presente invención, la disolución de la fracción I + II + III o la fracción II + III en la etapa (a) se realiza mediante la adición de agua destilada a la fracción de manera que la proporción de la fracción I + II + III o la fracción II + III con respecto al agua destilada es 1:6 a 1:10, y el agua destilada puede ser agua destilada para inyección.

60

La fracción de proteínas plasmáticas se suspende (disuelve) preferiblemente en agua y/o tampón a una temperatura y pH sustancialmente no desnaturizantes. El término "sustancialmente no desnaturizante" implica que la

65

condición a la que se refiere el término no causa una pérdida sustancial irreversible de la actividad funcional de las moléculas de IgG, por ejemplo, pérdida de la actividad de unión al antígeno y/o pérdida de la función biológica de Fc.

5 Ventajosamente, la fracción de proteína plasmática se disuelve en agua acidificada con al menos un tampón no desnaturalizante a volúmenes de 6 a 10, preferiblemente de 7 a 8, veces la fracción de proteína plasmática. El pH de la suspensión que contiene inmunoglobulina se mantiene preferiblemente a un pH por debajo de 6, tal como dentro del intervalo de 4,0-6,0, preferiblemente 4,1-4,3, para asegurar una solubilidad óptima de la inmunoglobulina. Se puede usar cualquier tampón ácido conocido en la técnica, pero el fosfato de sodio, el acetato de sodio, el ácido acético, el ácido clorhídrico o el agua (agua destilada) pueden usarse preferiblemente como el tampón ácido. En la presente invención, se usó agua destilada o agua destilada para inyección.

10 En la presente invención, la etapa (a) es una etapa de aislamiento de un sobrenadante que contiene inmunoglobulina de otras sustancias mediante precipitación.

15 El precipitante que se usa en la presente invención es el ácido caprílico.

La formación del precipitado en la etapa (a) se realiza agregando el precipitante a una concentración de 5-26 mM, preferiblemente 19-21 mM, y luego ajustando el pH de la solución a 4,0-6,0, preferiblemente 4,5-5,5. El ajuste del pH se puede realizar mediante la adición de ácido acético o hidróxido de sodio, pero no se limita a los mismos. Será obvio para los expertos en la técnica que otras sustancias que generalmente pueden usarse para el ajuste del pH pueden usarse en la presente invención.

20 La precipitación por adición del precipitante se realiza durante aproximadamente 1 hora, preferiblemente de 50 minutos a 1 hora y 10 minutos, hasta que se alcanza el equilibrio entre la fase sólida y la fase líquida. A lo largo de la precipitación, la suspensión se mantiene a una temperatura baja, preferiblemente de 2 a 6 °C, y la temperatura más adecuada depende de la identidad del precipitante de proteína.

25 El precipitado formado por precipitación contiene grandes cantidades de material de proteína agregado, y el sobrenadante contiene una inmunoglobulina, y por lo tanto solo el sobrenadante puede recogerse para purificar la inmunoglobulina. El sobrenadante que contiene inmunoglobulina se puede filtrar adicionalmente para eliminar, por ejemplo, agregados grandes, coadyuvante de filtración y pasta residual no disuelta. La filtración se realiza preferiblemente por medio de filtros de profundidad, por ejemplo, C150 AF, AF 2000 o AF 1000 (Schenk), 30LA (Cuno) o filtros similares. En algunos casos, la eliminación de agregados, coadyuvante de filtración y material residual de proteína no disuelta también se puede llevar a cabo mediante centrifugación.

30 En la presente invención, para extraer una inmunoglobulina de la pasta de la fracción I + II + III, se añadió agua destilada o WFI (agua destilada para inyección) de modo que la proporción de la pasta de la fracción I + II + III con respecto al agua destilada fuera de 1:6 a 1:10 y la concentración de proteína extraída sería 15 mg/ml. El pH de la solución se ajustó a $4,2 \pm 0,1$ usando ácido acético 1 M, seguido de extracción de la pasta de la fracción I + II + III.

35 Se añadió una solución de caprilato de sodio 1 M al extracto de tal manera que la concentración de caprilato fuera de $20 \pm 1,0$ mM, y luego la solución del extracto se ajustó a un pH de $5,1 \pm 0,1$ usando ácido acético 1 M o hidróxido de sodio 0,5 M (NaOH), y sometido a precipitación a 4 °C durante 1 hora \pm 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se filtró a través de un filtro de profundidad para obtener una solución de inmunoglobulina.

40 En la presente invención, la etapa (b) es una etapa para concentrar la inmunoglobulina y eliminar las impurezas. En esta etapa, la concentración de la inmunoglobulina se controla a 10-50 mg/ml, preferiblemente 20-30 mg/ml, y la cromatografía de intercambio aniónico se realiza a un pH de 5,0-6,0 y un caudal de 95-145 cm/h. Una fracción no unida a la columna utilizada para realizar la cromatografía de intercambio aniónico se recupera con 1,6-2,0 volúmenes de carga (LV). Preferiblemente, el pH se ajusta a 5,4-5,8, más preferiblemente 5,5-5,7.

45 La solución concentrada que contiene inmunoglobulina puede someterse a cromatografía de intercambio aniónico o catiónico en una o más etapas para eliminar el precipitante y otras proteínas plasmáticas, incluida la inmunoglobulina A (IgA), la albúmina y los agregados. En la presente invención, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico para eliminar el caprilato y otras proteínas plasmáticas de la solución concentrada que contiene inmunoglobulina.

50 La resina de intercambio aniónico que se usa en la etapa de cromatografía de intercambio aniónico puede estar sustituida con grupos dietilaminoetilo (DEAE) o amonio cuaternario, pero no se limita a los mismos. Preferiblemente, la resina de intercambio aniónico puede ser cualquiera seleccionada entre las resinas de intercambio aniónico que tienen un grupo de amonio cuaternario fuertemente básico o un grupo dietilaminoetilo (DEAE) débilmente básico.

55 Por ejemplo, como una resina de intercambio aniónico fuertemente básica, Q Sepharose Fast Flow, Q Sepharose High Performance, Resource Q, Source 15Q, Source 30Q, Mono Q, Mini Q, Capto Q, Capto Q ImpRes, Q HyperCel, Q Cermic HyperD F, Nuvia Q, UNOsphere Q, Macro-Prep High Q, Macro-Prep 25 Q, Fractogel EMD TMAE (S), Fractogel EMD TMAE Hicap (M), Fractogel EMD TMAE (M), Eshmono Q, Toyopearl QAE- 550C, Toyopearl SuperQ-

650C, Toyopearl GigaCap Q-650M, Toyopearl Q-600C AR, Toyopearl SuperQ-650M, Toyopearl SuperQ-650S, TSKgel SuperQ-5PW (30), TSKgel SuperQ-5PW (20), TSKgel SuperQ-5PW o se pueden usar similares, pero no se limitan a los mismos, y se puede usar cualquier resina de intercambio aniónico conocida en la técnica.

5 El volumen apropiado de resina usado en la cromatografía de intercambio aniónico se refleja en las dimensiones de la columna, es decir, el diámetro de la columna y la altura de la resina, y varía dependiendo, por ejemplo, de la cantidad de inmunoglobulina en la solución aplicada y la capacidad de unión de la resina utilizada. Antes de realizar la cromatografía de intercambio aniónico, la resina de intercambio aniónico se equilibra preferiblemente con un tampón que permite que la resina se una a sus contraiones.

10 En la presente invención, la resina de intercambio aniónico usada es Q Sepharose Fast Flow, y los tampones de columna usados pueden ser tampones de equilibrio conocidos en la técnica, por ejemplo, tampón de fosfato de sodio, tampón de citrato, tampón de acetato o similares, tampón de lavado y tampón de elución.

15 La columna para la cromatografía de intercambio aniónico se cargó con tampón de acetato de sodio (NaOAc) $25 \pm 0,5$ mM de manera que el pH fuera de $5,6 \pm 0,1$, y el caudal de la fase móvil se ajustó a 120 ± 25 cm/h. La solución concentrada de inmunoglobulina se cargó en la columna en una cantidad de $90,0 \pm 20$ mg/ml.

20 En la presente invención, la etapa (c) es una etapa de inactivación de virus tales como virus potenciales envueltos en lípidos en la solución que contiene inmunoglobulina y luego eliminar la sustancia usada para la inactivación. En esta etapa, se puede usar un agente de inactivación de virus, preferiblemente un disolvente y/o un detergente. Lo más preferiblemente, puede usarse un tratamiento con disolvente y detergente que emplea una mezcla de disolvente y detergente.

25 Mediante la etapa (c), los virus con envoltura lipídica (por ejemplo, VIH1 y VIH2, hepatitis tipo C y no ABC, HTLV 1 y 2, la familia del virus del herpes, que incluye el CMV y el virus de Epstein Barr) pueden inactivarse, y por lo tanto la seguridad del producto final se puede aumentar.

30 En la etapa (c), cualquier disolvente y detergente puede usarse sin limitación, siempre que tengan la capacidad de inactivar virus, particularmente virus con envoltura lipídica. El detergente se puede seleccionar del grupo que consiste en detergentes no iónicos y iónicos y se selecciona preferiblemente para que sea sustancialmente no desnaturizante. Particularmente, un detergente no iónico es preferible en términos de facilidad de extracción. El disolvente es más preferiblemente tri-n-butil fosfato (TNBP) como se divulga en la patente de los Estados Unidos No. 4.764.369, pero no se limita al mismo.

35 El agente inactivador de virus que se usa en la presente invención es preferiblemente una mezcla de TNBP y al menos uno seleccionado entre polisorbato 80 (Tween 80), Triton X-100 y Triton X-45, pero no está limitado a los mismos.

40 La mezcla preferida de solvente/detergente se agrega de tal manera que la concentración de TNBP en la solución que contiene inmunoglobulina es 0,2-0,6% en peso, preferiblemente 0,24-0,36% en peso, y de tal manera que la concentración de Tween 80 es 0,8-1,5% en peso, preferiblemente 0,8-1,2% en peso.

45 La etapa de inactivación del virus se realiza en condiciones que inactivan los virus con envoltura, lo que da como resultado una solución que contiene inmunoglobulina sustancialmente segura contra virus. Dichas condiciones incluyen una temperatura de 4-30 °C, preferiblemente 19-28 °C, lo más preferiblemente 24-26 °C, y un tiempo de incubación de 1-24 horas, preferiblemente 4-12 horas, lo más preferiblemente aproximadamente 8 horas, para garantizar una inactivación suficiente del virus.

50 En la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico en la etapa (c) puede realizarse a un pH de 4,5-5,5 y un caudal de 110-130 cm/h. Preferiblemente, el pH se ajusta a 4,9-5,1. La cantidad de inmunoglobulina cargada en la resina de intercambio catiónico es 90-130 **mg/ml** de la resina de intercambio catiónico, preferiblemente 95-105 **mg/ml** de la resina. Después de la adsorción de la inmunoglobulina, se realiza el lavado con tampón de equilibrio. El tampón de equilibrio que se usa en el lavado puede usarse en una cantidad de al menos tres volúmenes de columna, preferiblemente al menos cinco volúmenes de columna. Después del lavado, la inmunoglobulina se eluye con al menos 8 volúmenes de columna de tampón de elución.

55 En la presente invención, se usa una resina de intercambio catiónico a base de cerámica. En un ejemplo de la presente invención, se usó el gel CM Hyper D que es una resina a base de cerámica como resina de intercambio catiónico y se utilizaron tampón de equilibrio conocido en la técnica, tal como tampón de fosfato de sodio, tampón de citrato o tampón de acetato, tampón de lavado y tampón de elución como los tampones de columna.

60 La elución de la inmunoglobulina de la resina de intercambio catiónico se realiza con un tampón sustancialmente no desnaturizante que tiene un pH y una fuerza iónica suficientes para provocar una elución eficiente de la IgG, recuperando así un eluato que contiene inmunoglobulina. En el presente documento, "elución eficiente" significa que

65

al menos el 75%, tal como al menos el 80%, por ejemplo, al menos el 85%, de la solución de inmunoglobulina cargada en la resina de intercambio catiónico se eluye de la resina de intercambio catiónico.

5 En la presente invención, la cromatografía de intercambio catiónico en la etapa (c) se realiza a una concentración salina de 400-600 mM, preferiblemente 500 mM.

En la presente invención, la etapa (d) es una etapa de eliminación adicional de impurezas.

10 Para mantener el contenido de polímeros en diálisis y/o concentración, la etapa (d) se realiza en un estado en el que la concentración salina del eluato obtenido de la columna de cromatografía de intercambio catiónico se mantiene a 50-150 mM. Cuando se utiliza un procedimiento de elución que permite mantener una baja concentración salina en la etapa de elución de la proteína, el contenido de polímero de la inmunoglobulina se puede minimizar y, por lo tanto, la inmunoglobulina con mayor calidad se puede purificar. En la presente invención, el eluato obtenido a partir de la resina de intercambio catiónico se mantuvo a una concentración salina de 100 mM o menos para mantener el
15 contenido de polímero.

En la presente invención, la diálisis y/o concentración en la etapa (d) se pueden realizar usando un sistema de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF). Se realiza a una presión osmótica de 10 mOsmol/kg o inferior, y luego el pH se ajusta a 5,5-6,5. A saber, el eluato de la columna de cromatografía de intercambio catiónico se dializa y se concentra, y la diálisis y la concentración por diafiltración y ultrafiltración, respectivamente, se realizan en una etapa. Las membranas empleadas para la diafiltración/ultrafiltración tienen ventajosamente un corte de peso nominal dentro del intervalo de 50.000 Da.
20

En la presente invención, la diafiltración se realizó para eliminar iones de bajo peso molecular del eluato de cromatografía de intercambio catiónico, y la presión osmótica en el sistema UF/DF se mantuvo a 10 mOsmol/kg o menos. Se encontró que la inmunoglobulina dializada y/o concentrada se concentró a $1,5 \pm 0,1$ medida por un refractómetro (medidor T/S).
25

En la presente invención, la cromatografía de intercambio aniónico en la etapa (d) se realiza a un pH de 5,5-6,5 y un caudal de 90-150 cm/h, y una fracción no unida a la columna utilizada para realizar la cromatografía de intercambio aniónico se recupera con 0,8-1,2 volúmenes de carga (LV). Preferiblemente, el pH puede ajustarse a 5,78-6,30, preferiblemente 6,0-6,2, y la fracción no unida a la columna de cromatografía de intercambio aniónico puede recuperarse preferiblemente con 0,96-1,04 volúmenes de carga (LV).
30

Además, en la etapa (d), el pH de la fracción no unida a la columna de cromatografía de intercambio aniónico se puede ajustar a 4,0-5,5, preferiblemente 4,3-4,7, mediante la adición de un ácido, preferiblemente ácido sulfúrico 1 M, ácido clorhídrico o ácido acético
35

En la presente invención, se usó EMD TMAE (Fractogel EMD TMAE) como la resina de intercambio aniónico. Se empacó en la columna y luego se equilibró con tampón de acetato de sodio (NaOAc) $20 \pm 1,0$ mM de modo que el pH fuera $6,1 \pm 0,05$. El caudal de la fase móvil se ajustó a 120 ± 30 cm/h. La solución dializada y/o concentrada de inmunoglobulina se cargó en la columna en una cantidad de $110,0 \pm 10$ mg/mL, y la fracción no unida a la columna de cromatografía de intercambio aniónico se recuperó con $1,0 \pm 0,04$ volúmenes de carga, y luego se ajustó a un pH de $4,5 \pm 0,2$ mediante la adición de ácido acético 1M.
40
45

En la presente invención, la filtración en la etapa (e) puede realizarse usando un sistema de nanofiltración o ultrafiltración/diafiltración. La nanofiltración puede realizarse a una presión de 2,0-3,0 bar, y la ultrafiltración/diafiltración puede realizarse a una presión osmótica de 10 mOsmol/kg o inferior, y luego el pH puede ajustarse a 4,5-5,5.
50

La nanofiltración es una etapa importante de eliminación de virus. En esta etapa, la fracción no unida a la segunda columna de cromatografía de intercambio aniónico se filtró a través de un prefiltro Pall DVD y un filtro de virus DV20 a una presión de $2,5 \pm 0,5$ bar, preferiblemente $2,5 \pm 0,2$ bar, para eliminar los virus de la solución de inmunoglobulina. Luego, se realizó la diafiltración usando un sistema de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) a una presión de 10 mOsmol/kg o menos para eliminar los iones de bajo peso molecular.
55

El procedimiento de la presente invención puede comprender además, después de la etapa (e), una etapa de adición de un estabilizador para preparar una inmunoglobulina para inyección intravenosa.

60 En la presente invención, un estabilizador que se puede agregar puede ser al menos uno seleccionado entre alcohol de azúcar, maltosa, sorbitol, manosa, glucosa, trehalosa, albúmina, lisina, glicina, PEG y Tween 80. Preferiblemente, la glicina es utilizada como el estabilizador.

El estabilizador se puede agregar a una concentración de 200-300 mM. Después de la adición del estabilizador, el pH de la solución de inmunoglobulina se puede ajustar a 4,5-5,5. Preferiblemente, el pH puede ajustarse a 4,7-4,9 añadiendo un ácido, preferiblemente ácido sulfúrico o ácido clorhídrico.
65

En la presente invención, para la estabilización de la inmunoglobulina, se añadió glicina a la solución dializada y/o concentrada de inmunoglobulina a una concentración final de 250 ± 50 mM y se mezcló completamente, y luego la solución se ajustó a un pH de $4,8 \pm 0,1$ mediante la adición de ácido clorhídrico 0,5N, y esterilizado usando un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ y se almacenó.

La preparación de inmunoglobulina esterilizada para inyección intravenosa puede diluirse o concentrarse de modo que la concentración de la proteína (inmunoglobulina purificada) es de 1-30% en peso. En la presente invención, la preparación de inmunoglobulina esterilizada se diluyó con WFI o se concentró mediante ultrafiltración de modo que la concentración de proteína fuera de 40-60 g/l, preferiblemente 45-55 g/l, más preferiblemente 49,5-50,5 g/l. Luego, se añadió glicina a la solución de inmunoglobulina a una concentración final de 250 ± 50 mM y se mezcló completamente, y se añadió ácido clorhídrico a la solución de inmunoglobulina para ajustar el pH a $4,8 \pm 0,1$, obteniendo de esta manera una preparación de inmunoglobulina intravenosa.

Se divulga adicionalmente una inmunoglobulina intravenosa preparada de acuerdo con el procedimiento de preparación de la presente invención.

En un ejemplo de la presente invención, se midió la pureza (trombina/IgG) de una solución de inmunoglobulina en cada etapa de preparación y la concentración de FXI (factor de coagulación humano XI) en un filtrado o precipitado en cada etapa de preparación. Como resultado, se pudo observar que se purificó una solución de inmunoglobulina con una pureza de 99% o más (Figura 2) y que se eliminó mayormente el factor de coagulación FXI (Tabla 2 y Figura 3).

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1: preparación de inmunoglobulina intravenosa

1-1: Preparación de plasma

Como plasma, se usó plasma aprobado por la FDA que se sometió a Biotest, incluyendo pruebas de amplificación de ácido nucleico en virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de hepatitis C (VHC), virus de hepatitis B (VHB) y parvovirus B19, y pruebas de serología

En la presente invención, se usó el plasma de Estados Unidos (Lote N° 600B0491). El plasma se almacenó a -20 °C o menos hasta su uso. Se abrió una botella que contenía el plasma con una máquina cortadora de botellas, y el plasma se descongeló por incubación en un recipiente encamisado a $1-6$ °C durante 12-72 horas.

Mientras que el plasma se descongeló en las condiciones descritas anteriormente, se produjo un crioprecipitado que contenía fibrinógeno y factores de coagulación. El crioprecipitado producido se eliminó por centrifugación, y se recuperó el restante plasma desprovisto de crioprecipitado.

1-2: Precipitación I

Se añadió etanol al 96% al plasma desprovisto de crioprecipitado recuperado en el Ejemplo 1-1, de modo que la concentración final de etanol fuera de $8 \pm 0,8\%$ a -3 ± 1 °C, y luego se ajustó el pH de la solución a $7,2 \pm 0,2$ usando tampón de acetato. Si la recuperación de la precipitación I se realiza depende del consumo de un producto del proceso. En la presente invención, se realizó un proceso de precipitación I, pero no se realizó la eliminación de un precipitado por centrifugación.

1-3: Precipitación II + III y filtración

Después del proceso de precipitación I, se realizó una etapa de precipitación II + III para precipitar adicionalmente la inmunoglobulina contenida en el plasma desprovisto de crioprecipitado.

En el plasma desprovisto de crioprecipitado sometido a la etapa de precipitación I, se añadió adicionalmente etanol al 96% de modo que la concentración final de etanol fuera del $20 \pm 2\%$ a $-5 \pm 1,0$ °C. Luego, el pH de la solución se ajustó a $6,9 \pm 0,1$ utilizando tampón de acetato.

A continuación, se añadió un filtro auxiliar (Celpure 300 o Celpure 1000) a la solución en una cantidad de $0,0284$ kg/kg de plasma y se mezcló durante 30 ± 10 minutos. La mezcla se separó en un sobrenadante y un precipitado en una prensa de filtro (información del dispositivo) en una habitación fría mantenida a una temperatura de 2 a 8 °C.

El sobrenadante se denominó "sobrenadante I + II + III (o II + III)", y el precipitado se denominó "fracción I + II + III w (o II + III w)" (w; lavado). La fracción I + II + III w (o II + III w) se usó inmediatamente o se almacenó a -20 °C o menos.

1-4: Extracción de la pasta de la fracción I + II + III, precipitación con caprilato, filtración y concentración

Para extraer una inmunoglobulina de la pasta de la fracción I + II + III obtenida en el Ejemplo 1-3, se añadió agua destilada o WFI (agua destilada para inyección) a la pasta de la fracción I + II + III de manera que la proporción de la pasta de la fracción I + II + III con respecto al agua destilada fuera de 1:6 a 1:10 y la concentración de la proteína extraída fuera de 15 mg/ml. A continuación, la solución se ajustó a un pH de $4,2 \pm 0,1$ mediante la adición de ácido acético 1 M, y luego la pasta de la fracción I + II + III se extrajo a una temperatura de 2 a 8 °C durante $11 \pm 0,5$ horas.

Se añadió una solución de caprilato de sodio 1 M al extracto de modo que la concentración de caprilato fuera de $20 \pm 1,0$ mM. A continuación, la solución del extracto se ajustó a un pH de $5,1 \pm 0,1$ mediante la adición de ácido acético 1 M o hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M, y se sometió a precipitación a 4 °C durante 1 hora \pm 10 minutos. A continuación, se recuperó el sobrenadante y se recuperó una solución de inmunoglobulina del sobrenadante mediante el uso de cartuchos de filtro de profundidad (filtro Ahlstrom-924, filtro Ahlstrom-950). La solución de inmunoglobulina recuperada se concentró a 28 ± 2 mg/ml.

1-5: Primera cromatografía de intercambio aniónico

A fin de eliminar el caprilato y otras proteínas plasmáticas de la solución concentrada de inmunoglobulina obtenida en el Ejemplo 1-4, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico.

La resina de intercambio aniónico Q Sepharose FF (GE Healthcare, catálogo No. 17-0510) se empacó en una columna y luego se equilibró con tampón de equilibrio (acetato de sodio (NaOAc) $25 \pm 0,5$ mM, pH 5,6) de modo que el pH fuera de $5,6 \pm 0,1$. A continuación, la solución concentrada de inmunoglobulina obtenida en el Ejemplo 1-4 se cargó en la columna en una cantidad de $90,0 \pm 20$ mg/mLr a una temperatura de 25 °C o superior y un caudal de 120 ± 25 cm/h. A continuación, se recuperó una fracción no unida a la columna de cromatografía de intercambio aniónico con 1,6-2,0 volúmenes de carga (LV).

1-6: Tratamiento con disolvente/detergente

Con el fin de inactivar los virus potenciales con envoltura lipídica en la solución que contiene inmunoglobulina, se realizó una etapa de tratamiento de la solución que contiene inmunoglobulina con un disolvente y un detergente.

Primero, para ajustar el pH de la fracción a $5,0 \pm 0,1$, se añadió ácido acético a la fracción no unida a la columna de cromatografía de intercambio aniónico y se recuperó en el Ejemplo 1-5. Luego, se agregaron tri(n-butil)fosfato (TNBP) y polisorbato 80 (Tween 80) a la fracción a concentraciones de $0,3 \pm 0,06\%$ y $1 \pm 0,2\%$, respectivamente, seguido de agitación a 200 ± 50 RPM durante 20-30 minutos. Para saber si TNBP y Tween 80 en la solución se mezclaron uniformemente, se tomó una muestra y se analizó una porción de la solución. Posteriormente, la solución se agitó continuamente a $25 \pm 1,0$ °C y 200 ± 50 RPM durante 8 horas.

1-7: Cromatografía de intercambio catiónico

Para eliminar TNBP, Tween 80 y otras impurezas tales como factores de coagulación de la solución de inmunoglobulina tratada con el disolvente/detergente, se realizó una cromatografía de intercambio catiónico.

La resina de intercambio catiónico gel CM Hyper D (Pall Corporation; Catálogo No. 20050) que es un material cerámico se empacó en una columna y luego se equilibró con tampón de equilibrio (acetato de sodio (NaOAc) $25 \pm 0,5$ mM) de modo que el pH fuera $5,0 \pm 0,1$. A continuación, la solución de inmunoglobulina tratada con el disolvente/detergente en el Ejemplo 1-6 se cargó en la columna en una cantidad de $100,0 \pm 5$ mg/mLr a una temperatura de 20 ± 2 °C y un caudal de 120 ± 10 cm/h. Además, después de lavar con al menos 5 volúmenes de columna de tampón de lavado, la inmunoglobulina se eluyó con al menos 8 volúmenes de columna de tampón de elución (composición del tampón de elución: NaOAc 20 mM, pH 4,5 w/NaCl 0,5 M).

1-8: Diafiltración

Para eliminar los iones de bajo peso molecular del eluato de cromatografía de intercambio catiónico, se realizó la diafiltración.

El eluato obtenido en el Ejemplo 1-7 se diafiltró usando un sistema de ultrafiltración/diafiltración (Millipore Pellicon2 (50K)) a una presión osmótica de 10 mOsmol/kg o inferior. Para mantener el contenido de polímero de inmunoglobulina, se añadió el eluato de cromatografía de intercambio catiónico al concentrado de dializado calculado, y la ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) se realizó continuamente mientras se mantenía una concentración de cloruro de sodio de 100 mM o inferior.

1-9: Segunda cromatografía de intercambio aniónico

A fin de eliminar un polímero y otras proteínas plasmáticas de la solución de inmunoglobulina dializada y/o concentrada obtenida en el Ejemplo 1-8, se realizó una segunda cromatografía de intercambio aniónico.

La resina de intercambio aniónico Fractogel EMD TMAE (Merck-Millipore, Cat No. 116887) se empacó en una columna y luego se equilibró con tampón de equilibrio (acetato de sodio (NaOAc) $20 \pm 0,5$ mM, pH 6,1) de modo que el pH fuera $6,1 \pm 0,1$. A continuación, la solución concentrada de inmunoglobulina obtenida en el Ejemplo 1-8 se cargó en la columna en una cantidad de $110,0 \pm 10$ mg/mL a una temperatura de 20 ± 2 °C y un caudal de 120 ± 30 cm/h. Posteriormente, una fracción no unida a la columna de cromatografía de intercambio aniónico se recuperó con $1,0 \pm 0,04$ volúmenes de carga (LV), y luego se ajustó a un pH de $4,5 \pm 0,1$ mediante la adición de ácido clorhídrico.

1-10: Nanofiltración y diafiltración

La nanofiltración es una etapa importante de eliminación de virus. La solución de inmunoglobulina dializada/concentrada obtenida en el Ejemplo 1-9 se filtró a través de un prefiltro Florodynell (AB1DJL7PH4) a una presión de $2,0 \pm 0,5$ bar o inferior y se filtró a través de un filtro para virus (DV20, AB3DV207PH4) a una presión de $2,0 \pm 0,5$ bar para eliminar de ese modo los virus de la solución de inmunoglobulina.

A continuación, para eliminar los iones de bajo peso molecular, la solución de inmunoglobulina se diafiltró a una presión osmótica de 10 mOsmol/kg o inferior usando un sistema de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF).

1-11: Adición de estabilizador y elaboración de la preparación final

Para estabilizar la inmunoglobulina, se añadió glicina a la solución de inmunoglobulina dializada y/o concentrada a una concentración final de 250 ± 50 mM y se mezcló completamente, y luego se midió el pH de la solución de inmunoglobulina estabilizada, y se ajustó la solución de inmunoglobulina a un pH de $4,8 \pm 0,1$ mediante la adición de ácido clorhídrico 0,5 N. A continuación, el filtrado se esterilizó usando un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ y se almacenó en un tanque de almacenamiento de acero inoxidable.

La preparación de inmunoglobulina resultante para inyección intravenosa se diluyó con WFI o se concentró por ultrafiltración de modo que la concentración de proteína fuera de $50 \pm 0,5$ g/l. A continuación, se añadió glicina a la misma hasta una concentración final de 250 ± 50 mM y se mezcló completamente. Luego, la preparación de inmunoglobulina estabilizada se midió para determinar su pH y se ajustó a un pH de $4,8 \pm 0,1$ mediante la adición de ácido clorhídrico.

Después del ajuste del pH, la preparación de inmunoglobulina se esterilizó y se transfirió a una sala de empaque para preparar un producto que a su vez se almacenó a una temperatura de $2-8$ °C.

Ejemplo 2: Medición de trombina/IgG generada (riesgo tromboembólico) en una solución de inmunoglobulina en cada etapa de preparación

Se midió la pureza (trombina/IgG) de la preparación de inmunoglobulina muestreada en cada etapa del Ejemplo 1.

2-1: Método experimental

En la presente invención, la medición del riesgo tromboembólico en la solución de inmunoglobulina en cada etapa del Ejemplo 1 se realizó de acuerdo con el protocolo de Generación de Trombina (Protocolo 01 de Generación de Trombina CBER, Experimento (100916) a) proporcionado por el CBER (Center for Biologics Evaluation and Research), que es una de las seis organizaciones analíticas afiliadas de la FDA.

2-2: Resultados experimentales

El proceso de purificación de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención incluye el procedimiento de fraccionamiento de plasma de Cohn y las técnicas de purificación por cromatografía de intercambio iónico. Como se muestra en la Figura 2 y la Tabla 1 a continuación, se pudo observar que, en el proceso de precipitación con caprilato y los procesos de cromatografía de intercambio catiónico y segunda cromatografía de intercambio aniónico entre los procesos de purificación cromatográfica, la cantidad de trombina generada (que es una sustancia trombótica) se redujo efectivamente.

Tabla 1: Análisis del producto en cada proceso de preparación.

Procesos	Observación	Trombina (nM)
1. Extracción de pasta		266,4
2. Precipitación con caprilato		54,9
3. 1ª cromatografía de intercambio aniónico (AEX)	Porción cargada	71,9
	Porción aprobada	40,0

(continuación)

Procesos	Observación	Trombina (nM)
4. Cromatografía de intercambio catiónico (CEX)	Porción cargada	37,6
	Porción eluida	29,4
5. 2da cromatografía de intercambio aniónico (AEX)	Porción cargada	25,5
	Porción aprobada	7,4
6. Nanofiltración		9,1
7. Concentración		7,7
8. Solución sin procesar		14,5

5 Los resultados en la Tabla 1 anterior muestran que la trombosis que puede ser causada por la inyección intravenosa de la inmunoglobulina puede minimizarse para que el tromboembolismo causado por la trombosis pueda prevenirse eficazmente, maximizando de este modo la seguridad de la inmunoglobulina.

Ejemplo 3: Medición de la concentración de FXI (Factor XI de coagulación humana) en filtrado o precipitado en cada etapa de preparación

10 Para examinar el grado de eliminación de coagulantes, la concentración de FXI (Factor XI de coagulación humana) en el filtrado o precipitado muestreado en cada etapa de preparación del Ejemplo 1 se midió mediante ELISA (Kit AssayMax Human Factor XI (FXI) ELISA; ssaypro, número de catálogo EF1011-1) y SDS-PAGE.

Tabla 2: Contenido de FXI de los productos del proceso de purificación.

	Procesos	Observación	FXI (EIA)
			(ng/ml)
1	Extracción de pasta		732,77
2	Precipitación de caprilato		1,76
3	1ª cromatografía de intercambio aniónico (AEX)	Porción cargada	4,16
4		Porción aprobada	1,02
5	Cromatografía de intercambio catiónico (CEX)	Porción cargada	1,93
6		Porción eluida	2,16
7	2da cromatografía de intercambio aniónico (AEX)	Porción cargada	0,31
8		Porción aprobada	2,67
9	Nanofiltración		6,46
10	Concentración		4,89
11	Solución sin procesar		N.D

15 Los contenidos de FXI de los productos del proceso de purificación de acuerdo con la presente invención se midieron por ELISA y SDS-PAGE. Como resultado, se puede observar a partir de la Tabla 2 anterior y la Figura 3 que el FXI casi se eliminó en la precipitación con caprilato, la cromatografía de intercambio catiónico y la cromatografía de intercambio aniónico.

20 Aplicabilidad industrial

25 Como se describió anteriormente, de acuerdo con el procedimiento para preparar la inmunoglobulina intravenosa de acuerdo con la presente invención, se puede omitir una etapa de precipitación para preparar la fracción II a partir de la fracción I + II + III o la fracción II + III como material de partida, y los problemas, que incluyen un proceso complicado y un bajo rendimiento, que ocurre en el proceso de preparación convencional (tratamiento con polietilenglicol) que emplea el proceso de tratamiento con polietilenglicol, se puede resolver mediante el uso de la primera precipitación con caprilato de sodio, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de intercambio catiónico. Además, cuando se usa el procedimiento de purificación de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención, se puede aumentar la eficacia con la que se eliminan las impurezas y las sustancias trombóticas y se puede mantener el contenido de polímero de inmunoglobulina, y así se puede producir una inmunoglobulina estable con mayor calidad.

35 Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a las características específicas, será evidente para los expertos en la materia que esta descripción es solo para una realización preferente y no limita el alcance de la presente invención. Por lo tanto, el alcance sustancial de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de una inmunoglobulina, que comprende las etapas de:

- 5 (a) disolver la fracción I + II + III o fracción II + III de proteína plasmática que contiene inmunoglobulina, seguido de la realización de una reacción de precipitación añadiendo ácido caprílico;
- (b) eliminar un precipitado producido a partir de (a), seguido por la filtración de un sobrenadante que comprende inmunoglobulina, concentrar un filtrado, someter un concentrado a cromatografía de intercambio aniónico y recuperar una fracción no unida a la columna de la cromatografía de intercambio aniónico;
- 10 (c) tratar la fracción recuperada con un disolvente/detergente para inactivar virus, seguido por el sometimiento de la fracción a cromatografía de intercambio catiónico para eliminar el disolvente/detergente, en el que la cromatografía de intercambio catiónico se lleva a cabo usando una resina de intercambio catiónico a base de cerámica,
- 15 en el que la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a una concentración salina de 400-600 mM;
- (d) dializar y/o concentrar un eluato obtenido de la cromatografía de intercambio catiónico, sometiendo el eluato a cromatografía de intercambio aniónico y recuperar una fracción no unida a la columna de la cromatografía de intercambio aniónico, en el que una concentración salina del eluato obtenido a partir de la columna de cromatografía de intercambio catiónico en la etapa (c) se mantiene a 50-150 mM para mantener el contenido de polímeros durante la diálisis y/o concentración; y
- 20 (e) filtrar la fracción recuperada a través de un filtro de virus y dializar y/o concentrar el filtrado, obteniendo así una inmunoglobulina purificada.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la disolución de la fracción I + II + III o la fracción II + III de proteína plasmática que contiene inmunoglobulina en la etapa (a) se realiza mediante la adición de agua destilada a la fracción de manera que la proporción de la fracción I + II + III o la fracción II + III con respecto al agua destilada es de 1:6 a 1:10.
- 25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la reacción de precipitación en la etapa (a) se realiza agregando el precipitante a una concentración de 5-26 mM, y luego ajustando el pH de la solución a 4,0-6,0.
- 30 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cromatografía de intercambio aniónico en la etapa (b) se realiza a un pH de 5,0-6,0 y un caudal de 95-145 cm/h, y se obtiene una fracción no unida a la columna de cromatografía de intercambio aniónico con 1,6-2,0 volúmenes de carga (LV).
- 35 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el disolvente en la etapa (c) es fosfato de tri-n-butilo (TNBP), y el detergente es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en polisorbato 80, Triton X-100 y Triton X-45.
- 40 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cromatografía de intercambio catiónico en la etapa (c) se realiza a un pH de 4,5-5,5 y un caudal de 110-130 cm/h.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que una cantidad de adsorción de inmunoglobulina adsorbida en la resina de intercambio catiónico es 90-130 **mg/ml** de la resina de intercambio catiónico en la cromatografía de intercambio catiónico en la etapa (c).
- 45 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la diálisis y/o concentración en la etapa (d) se realiza usando un sistema de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) a una presión osmótica de 10 mOsmol/kg o inferior, y luego ajustando el pH a 5,5-6,5.
- 50 9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la cromatografía de intercambio aniónico en la etapa (d) se realiza a un pH de 5,5-6,5 y un caudal de 90-150 cm/h, y se obtiene una fracción no unida a la columna de cromatografía de intercambio aniónico con 0,8-1,2 volúmenes de carga (LV).
- 55 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que en la etapa (d), el pH de la fracción no unida a la columna de cromatografía de intercambio aniónico se ajusta a 4,0-5,5.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la filtración en la etapa (e) se realiza usando un sistema de nanofiltración o ultrafiltración/diafiltración.

FIG. 1

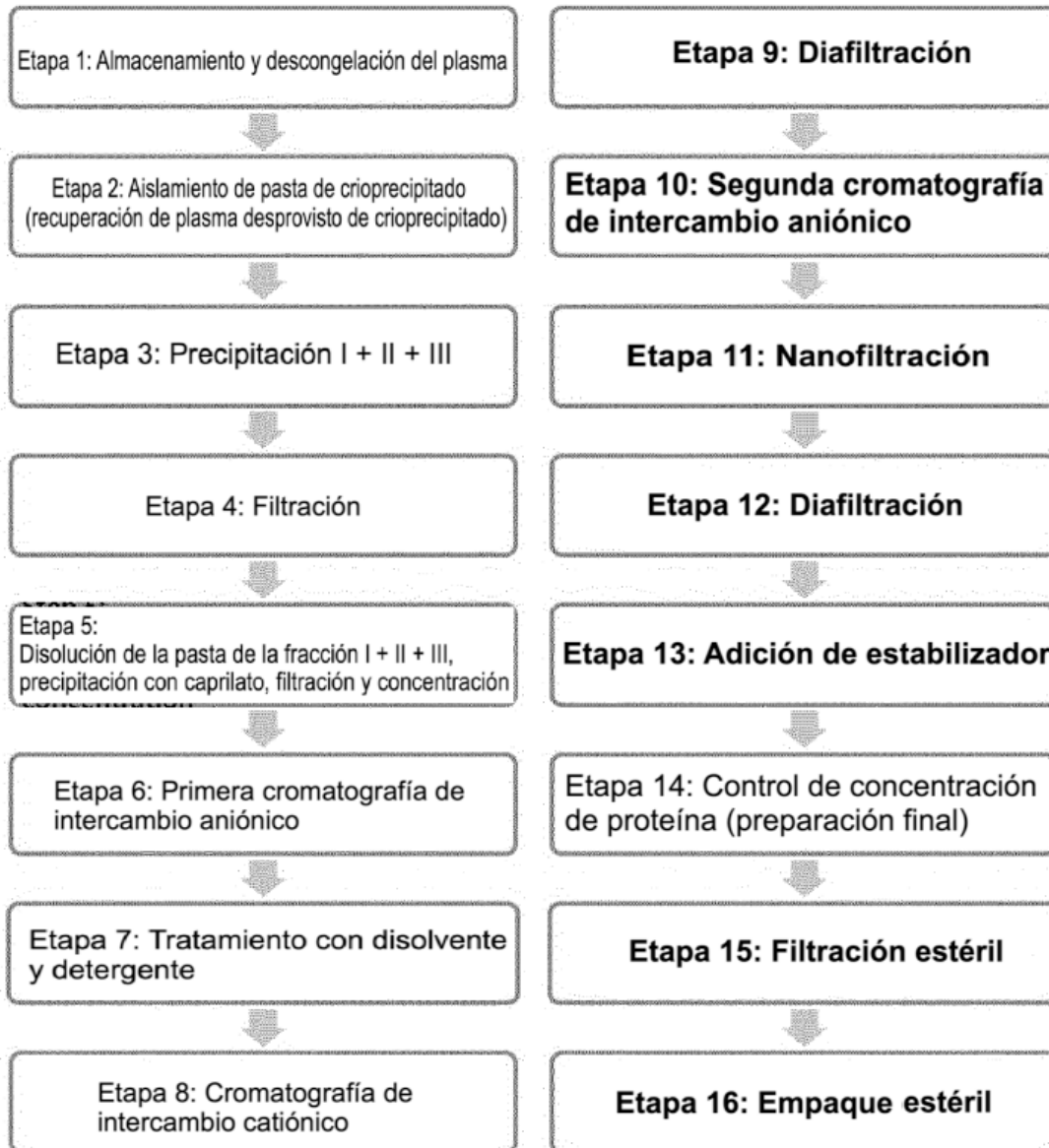


FIG. 2

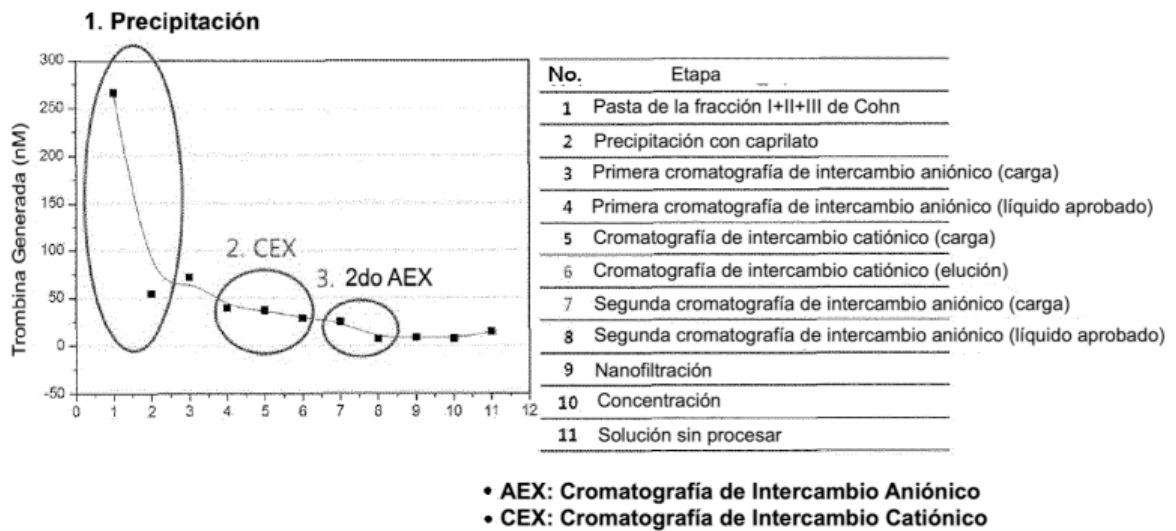
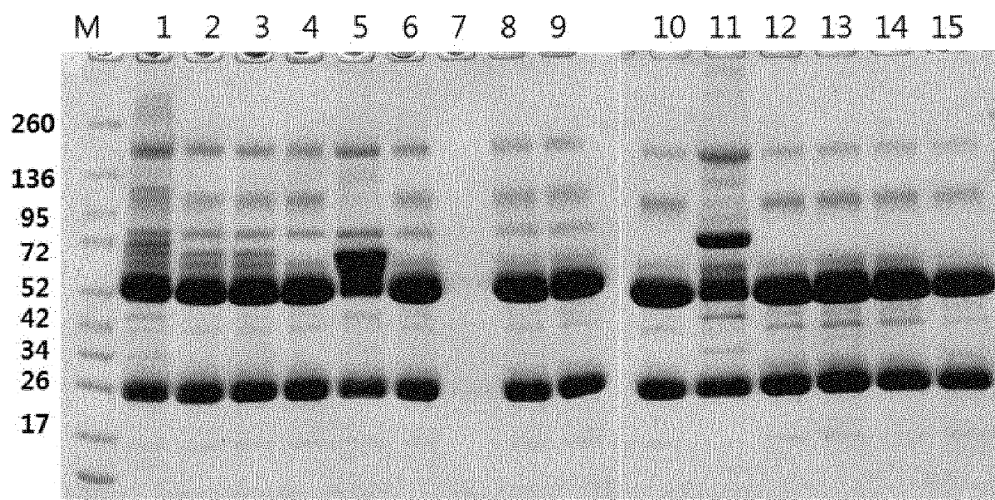


FIG. 3



- 1 Pasta de fracción I + II + III de Cohn
- 2 Precipitación con caprilato
- 3 Primera cromatografía de intercambio aniónico (carga)
- 4 Primera cromatografía de intercambio aniónico (líquido aprobado)
- 5 Primera cromatografía de intercambio aniónico (elución)
- 6 Cromatografía de intercambio catiónico (carga)
- 7 Cromatografía de intercambio catiónico (lavado)
- 8 Cromatografía de intercambio catiónico (elución)
- 9 Segunda cromatografía de intercambio aniónico (carga)
- 10 Segunda cromatografía de intercambio aniónico (líquido aprobado)
- 11 Segunda cromatografía de intercambio aniónico (elución)
- 12 Nanofiltración
- 13 Concentración
- 14 Solución sin procesar
- 15 Control interno