

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 176**

51 Int. Cl.:

B01D 15/38 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
B01J 20/289 (2006.01)
B01J 20/32 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2014 PCT/FR2014/051734**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15001277**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2014 E 14750552 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3016729**

54 Título: **Matriz de cromografía de afinidad**

30 Prioridad:

05.07.2013 FR 1356635
05.07.2013 FR 1356636

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2020

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
SOCIÉTÉ ANONYME (100.0%)
3, avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**PAOLANTONACCI, PHILIPPE y
CHTOUROU, ABDESSATAR**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 793 176 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

Matriz de cromografía de afinidad

5 La presente invención se refiere a una matriz para la realización de una cromatografía de afinidad, destinada a retener, y eliminar, unos anticuerpos dirigidos contra los antígenos del grupo sanguíneo A y/o del grupo sanguíneo B, de un producto sanguíneo.

Técnica anterior:

10 Actualmente, se tratan numerosas patologías mediante composiciones de inmunoglobulinas (Ig). Se pueden citar, por ejemplo, las deficiencias inmunitarias primarias con defecto de producción de anticuerpos, la enfermedad de Kawasaki, la púrpura trombopénica inmunológica del niño y del adulto, las deficiencias inmunitarias secundarias con defecto de producción de anticuerpos, en particular la leucemia linfóide crónica o mieloma asociadas a infecciones a repetición, 15 la infección del niño por el VIH asociada a infecciones bacterianas, las neuropatías motoras multifocales, el síndrome de Guillain-Barré, las infecciones agudas severas o crónicas de Parvovirus B19, la inmunodeficiencia adquirida o constitucional, la dermatomiositis corticorresistente, la miastenia aguda, la polirradiculoneuritis crónica idiopática, la púrpura trombocitopénica inmunológica, por ejemplo asociada a la infección por el VIH, el síndrome de la persona rígida (Stiffman síndrome), la neutropenia autoinmune, la eritroblastopenia autoinmune resistente, el síndrome de 20 anticoagulación adquirida por autoanticuerpo, la poliartritis reumatoide, las uveitis, etc.

La utilización en aumento de fracciones de plasma humano enriquecidas en Ig en terapia necesita la producción a gran escala, a partir por ejemplo de plasmas humanos, de concentrados de Ig altamente purificadas, inyectables por 25 vía intravenosa (IgIV), o subcutánea (Igsc).

Ahora bien, esta producción hace frente a numerosas obligaciones, en especialmente en términos de inocuidad de los concentrados de Ig obtenidos.

30 Según la farmacopea europea, a fin de reducir los riesgos de hemólisis, sus concentrados deben presentar un contenido reducido en anticuerpos dirigidos contra los antígenos del grupo sanguíneo A y/o del grupo sanguíneo B (designados en la descripción, de manera abreviada "anticuerpo antigrupos sanguíneo A" y "antigrupos sanguíneo B", o también "anticuerpo anti-A" y "anticuerpo anti-B" o también "isoglutininas anti-A" y "isoglutininas anti-B".

35 Dado que las necesidades en Ig están en constante aumento, es necesario disponer de pools cada vez más importantes de donantes, que serán estadísticamente más ricos en grupo sanguíneo O. Por lo tanto, se ha vuelto esencial disponer de procedimientos que permitan eliminar los anticuerpos anti-A y anti-B de los productos sanguíneos, durante la producción industrial de los concentrados de Ig a partir de pools de plasmas sanguíneos.

40 La solicitud WO2007/077365 describe un procedimiento de preparación de concentrados de Ig, que comprende una etapa de cromatografía de inmutafinidad que tiene como objetivo empobrecer estas en anticuerpo anti-A y anti-B.

45 La solicitud WO2013066251 se refiere a un procedimiento para reducir o eliminar un componente de un producto sanguíneo utilizando una circulación extracorporeal. Este procedimiento puede comprender una etapa en la que el producto sanguíneo se trata con un absorbente sobre el cual se inmovilizan unos ligandos de interés, especialmente unos péptidos o unos trisacáridos del grupo sanguíneo A o B. El documento WO2013066251 describe varios espaciadores utilizables para inmovilizar unos ligandos sobre la matriz del absorbente.

50 La solicitud AU2013200440 describe un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas desprovisto de anticuerpos anti-A y anti-B, de uso terapéutico, que comprende una etapa de eliminación de los anticuerpos anti-A y anti-B mediante la realización de una etapa de cromatografía de afinidad con la ayuda de matrices sobre las cuales se injertan unos ligandos oligosacáridicos que presentan una similitud con los grupos sanguíneos A y B.

Resumen de la invención:

55 La solicitante ha elaborado ahora un soporte, particularmente útil para retener, y eliminar, unos anticuerpos anti-A y/o anti-B de un producto sanguíneo, por cromatografía de afinidad a escala industrial.

60 La invención proporciona así una matriz de cromatografía de afinidad, en forma de gel, que comprende unas partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A y/o de grupo B, injertándose dicho oligosacárido a dichas partículas por medio de un espaciador, caracterizada por que la densidad de oligosacáridos es de aproximadamente 0,3 a 0,4 mg/ml de matriz y dicho espaciador consiste en un espaciador de fórmula $-NH-C_5H_{10}-CO-NH-C_3H_6-$, uniéndose dicho espaciador mediante su función amina a la 65 partícula. Un esquema de estas partículas injertadas se presenta en la figura 1.

En un modo de realización particular, la matriz comprende (i) unas partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A y/o (ii) unas partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B.

5 En un modo de realización preferido, la matriz comprende (i) unas partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y (ii) unas partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B. Este modo de realización se ilustra en la figura 4A.

10 En otro modo de realización, la matriz comprende unas partículas de polímero sobre las cuales se injertan al mismo tiempo un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B. Este modo de realización se ilustra en la figura 4B.

15 En un modo de realización particular, la matriz comprende una mezcla de (i) partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, (ii) partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B, y (iii) partículas de polímero sobre las cuales se injertan al mismo tiempo al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B. Este modo de realización se ilustra en la figura 4C.

20 En todos los modos de realización, el espaciador que une el ligando que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A a la partícula, y el espaciador que une el ligando que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B a la partícula pueden ser idénticos o diferentes, preferentemente idénticos, pero siempre de fórmula (I).

25 La invención se refiere también a la utilización de esta matriz, o soporte, en una cromatografía de afinidad que une unos anticuerpos anti-A y/o anti-B.

La invención contempla también la utilización de esta matriz, o soporte, para la producción a escala industrial de inmunoglobulinas G (IgG) para uso terapéutico.

30 La invención proporciona también un procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas (Ig) para uso terapéutico, que comprende la obtención de una composición de Ig a partir de plasma sanguíneo, por fraccionamiento etanólico y/o fraccionamiento caprílico y/o separación cromatográfica, y la eliminación de los anticuerpos anti-A y/o anti-B eventualmente presentes en la composición, mediante una cromatografía de afinidad que utiliza la matriz tal como se define aquí.

35 Una ventaja de esta matriz es su gran selectividad y especificidad frente a anticuerpos anti-A y anti-B, y su gran capacidad de unión a estos. En consecuencia, se hace posible reducir el tiempo de tratamiento de los productos a escala industrial, haciendo pasar una mayor cantidad de producto por volumen de columna.

40 Leyendas de las figuras:

La figura 1 representa un esquema simplificado de una partícula de polímero sobre la cual se injerta un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A o B. Según la invención, R₁ y R₂ son tales que el espaciador es de fórmula: -NH-C₅H₁₀-CO-NH-C₃H₆-.

La figura 2 representa un esquema simplificado de un modo de realización preferido de la invención, que representa una partícula de polímero sobre la cual se injerta un trisacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A.

50 La figura 3 representa un esquema simplificado de un modo de realización preferido de la invención, que representa una partícula de polímero sobre la cual se injerta un trisacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B.

La figura 4A representa un esquema simplificado de un modo de realización particular de la invención, de una matriz que comprende una mezcla de partículas que lleva un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y de partículas que llevan un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B.

La figura 4B representa un esquema simplificado de un modo de realización particular de la invención, de una matriz que comprende unas partículas que llevan al mismo tiempo un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B.

60 La figura 4C representa un esquema simplificado de un modo de realización particular de la invención, de una matriz que comprende una mezcla de partículas que lleva un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, de partículas que llevan un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B, y de partículas que llevan al mismo tiempo un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B.

Descripción detallada de la invención:

Soporte:

5 La matriz de la invención comprende un soporte a base de partículas de polímero, y está en forma de un gel.

10 Estas partículas de polímero son preferentemente de forma esférica u oblonga, puede tratarse especialmente de perlas. Estas partículas tienen generalmente un tamaño medio de aproximadamente 0,1 μm a aproximadamente 1000 μm , preferentemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 μm , más preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 μm , más preferentemente de aproximadamente 70 μm a aproximadamente 120 μm de diámetro.

15 Preferentemente, estas partículas son porosas.

El polímero puede ser natural o no natural, orgánico o inorgánico, reticulado o no reticulado.

El polímero es preferentemente un polímero orgánico, preferentemente reticulado.

20 En un modo de realización preferido, el polímero es la celulosa, y las partículas son preferentemente unas perlas de celulosas porosas.

Más preferentemente, se trata de celulosa reticulada.

25 Otros tipos de polímeros posibles incluyen agarosa, dextrán, poliacrilatos, poliestireno, poli(acrilamida, polimetacrilamida, unos copolímeros de estireno y divinilbenceno, o unas mezclas de estos polímeros.

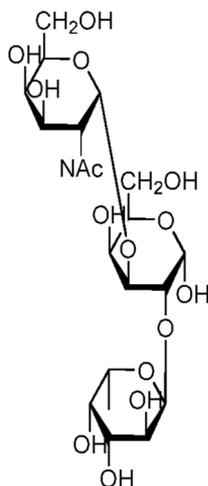
30 Las partículas pueden proporcionar un medio de cromatografía que se puede utilizar para llenar una columna por ejemplo.

Ligandos:

35 Los ligandos llevados por el soporte según la invención son unos oligosacáridos que representan los antígenos de los grupos sanguíneos A o B, que son naturalmente unas osas.

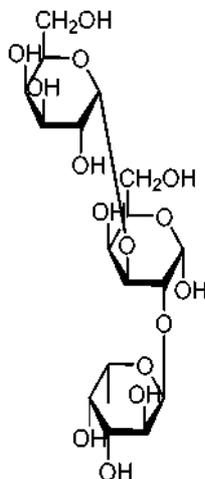
Más precisamente, el oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A y/o el oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B llevado(s) por la matriz según la invención son típicamente unos trisacáridos. La expresión "oligosacáridos que corresponden a un epítipo de grupo sanguíneo" se refiere a unos unidades idénticas o similares, desde un punto de vista antigénico, a los determinantes antigénicos reconocidos por los anticuerpos anti-A y anti-B respectivamente. Los ligandos llevados por el soporte según la invención son por lo tanto específicos de los anticuerpos anti-A o anti-B.

45 Preferentemente, el oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, utilizado como ligando en la invención, es un trisacárido N-acetilgalactosamina (GalNAc)-Galactosa(Gal)-Fucosa, más precisamente N-acetilGal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal, el espaciador se enlaza por el átomo de oxígeno enlazado preferentemente al carbono en posición 1 de la galactosa:



El oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B, utilizado como ligando en la invención, es preferentemente un oligosacárido Galactosa-Galactosa-Fucosa, más precisamente Gal α 1-3((Fuc α 1-2)Gal, el espaciador se enlaza por el átomo de oxígeno enlazado preferentemente al carbono en posición 1 de la galactosa:

5



Espaciador:

10 El ligando se enlaza de manera covalente al espaciador, que une el ligando a las partículas.

El espaciador permite reducir el volumen estérico y aumentar la accesibilidad del ligando frente a anticuerpos anti-A y anti-B a enlazar.

15 El espaciador sirve para inmovilizar, en una partícula, o bien un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, que es preferentemente un trisacárido N-acetilGal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal tal como se ha descrito antes, o bien un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B, que es preferentemente un trisacárido Gal α 1-3(Fuc α 1-2)Gal tal como se ha descrito antes.

20 Una partícula puede llevar varios espaciadores.

El enlace entre el ligando y el espaciador puede ser, por ejemplo, un enlace amida.

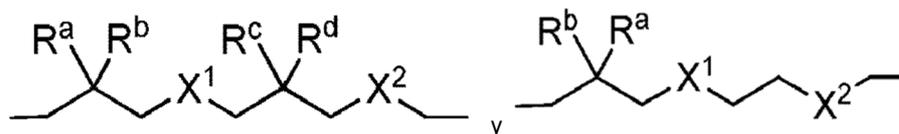
El espaciador comprende típicamente al menos un átomo de C, O, N o S.

25

Se describen unos espaciadores de tipo $-(CH_2)_mX(CH_2)_n-$ o $-(CH_2)_mX_1(CH_2)_nX_2(CH_2)_p-$, en los que X, X1, y X2 se seleccionan cada uno, independientemente el uno del otro, entre O, S, NH, y un enlace covalente; y m, n y p son cada uno independientemente, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Se pueden sustituir 1, 2 o 3 de los átomos de hidrógeno anteriores por un número equivalente de grupos OH y/o metilo.

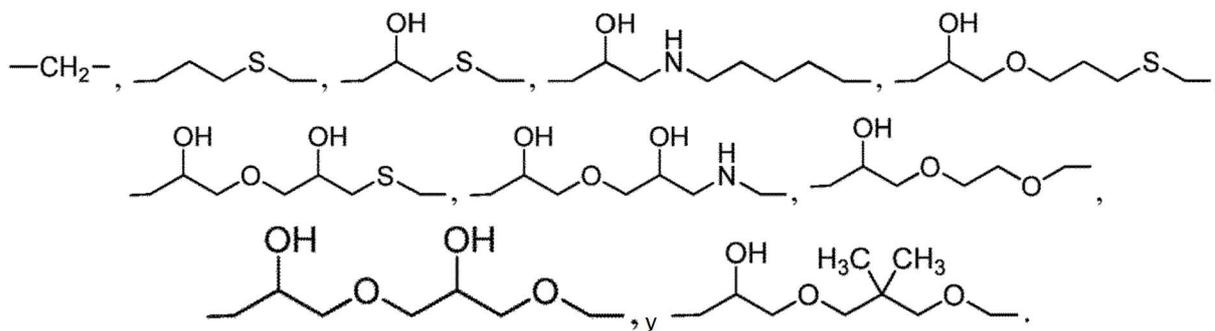
30

Se describe también un espaciador que comprende una estructura seleccionada entre



35 en las que cada uno de X1 y X2 se selecciona independientemente entre O, S y NH; y cada uno de Ra, Rb, Rc y Rd se selecciona independientemente entre H, OH, y metilo.

Se describe también un espaciador que comprende una estructura seleccionada entre



5 Se describe también un espaciador que presenta la fórmula (I) -NH-R1-CO-NH-R2- , en la que R1 es un grupo alquilo de C4-C6, R2 es un grupo alquilo de C3-C8, y dicho espaciador se enlaza mediante su función amina a la partícula (en negrita anteriormente). Un esquema de esta matriz se presenta en la figura 1.

10 R1 es un grupo alquilo de C4-C6, lineal o ramificado, preferentemente lineal. Según la invención, R1 es un grupo alquilo de C5.

15 R2 es un grupo alquilo de C3-C8, lineal o ramificado, preferiblemente lineal. Según la invención, R2 es un grupo alquilo de C3.

20 Según la invención, los ligandos (que son preferentemente unos trisacáridos tales como se han descritos anteriormente) se injertan a las partículas por un espaciador que consiste en un espaciador de fórmula: (partícula)- $\text{NH-C}_5\text{H}_{10}\text{-CO-NH-C}_3\text{H}_6\text{-(ligando)}$.

25 En un modo de realización preferido, se mezclan perlas de celulosa reticulada sobre las cuales se injertan unos ligandos que son unos trisacáridos que corresponden a un epítipo del grupo sanguíneo A (N-acetilgalactosamina (GalNAc)-Galactosa(Gal)-Fucosa), como se representa en la figura 2, y perlas de celulosa reticulada sobre las cuales se injertan unos ligandos que son unos trisacáridos que corresponden a un epítipo del grupo sanguíneo B (Galactosa-Galactosa-Fucosa), como se representa en la figura 3. Los trisacáridos se injertan a las perlas por un espaciador de fórmula: (perla)- $\text{NH-C}_5\text{H}_{10}\text{-CO-NH-C}_3\text{H}_6\text{-(ligando)}$.

30 Preparación de la matriz:

Los ligandos se inmovilizan químicamente mediante enlaces covalentes entre las partículas y el espaciador, y entre el espaciador y el ligando.

Esta inmovilización se puede realizar de manera clásica por el experto en la materia.

En un modo de realización preferido, la partícula lleva un brazo -NH-R1-COOH en el que R1 es C_5H_{10} de tal manera que se trata de ácido ϵ -aminocaproico (en el que R1 es un grupo pentilo).

35 De manera clásica, la partícula puede activarse utilizando unos reactivos bifuncionales tales como la epíclorhidrina, la epibromhidrina, dibromo- y dicloropropanol, dibromobutano, el etilenglicol diglicidiléter, el butanodiol diglicidiléter, la divinilsulfona, el alilglicidiléter, y el bromuro de alilo. El reactivo bifuncional es capaz de reaccionar al mismo tiempo con las partículas y el brazo -NH-R1-COOH . Los compuestos heterofuncionales alilo, tales como el bromuro de alilo, son unos reactivos bifuncionales preferidos y permiten obtener una matriz activada.

40 Para algunos soportes sólidos, tales como la celulosa, los compuestos que contienen un hidrogel u otros materiales que presentan unos grupos hidroxilos, es ventajoso desprotonar los grupos hidroxilos con una fuente de hidróxido, por ejemplo, antes de la reacción con un reactivo bifuncional.

45 Los ligandos que representan los antígenos de los grupos sanguíneos A y/o B se inmovilizan después sobre la partícula activada que lleva el brazo -NH-R1-COOH por medio de un grupo enlazador -NH-R2- , en el que R2 es $\text{-C}_3\text{H}_6$. Para ello, la función COOH del brazo -NH-R1-COOH portada por la partícula se pone a reaccionar con la función NH_2 del ligando $\text{NH}_2\text{-R2-oligosacárido}$, mediante la utilización de un agente de condensación de tipo N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ).

50 El experto en la materia puede injertar o bien un ligando que representa un antígeno de grupo A o bien que representa un antígeno de grupo B, o también los dos, en la misma partícula. Preferentemente, el espaciador utilizado es idéntico. Esto es particularmente ventajoso para asegurar un injerto equivalente de ligandos que representan un antígeno de grupo A con respecto a los ligandos que representan un antígeno de grupo B. El experto en la materia sabe, por otro lado, colocarse en condiciones adaptadas, en función de la reactividad de los ligandos frente a partículas, para obtener

unas partículas que llevan una proporción determinada de ligandos que representa un antígeno de grupo A con respecto a los ligandos que representan un antígeno de grupo B.

5 La matriz en forma de gel se prepara por adición clásica de un tampón sobre las partículas de polímero que llevan los ligandos, como se conoce por el experto en la materia, para obtener una matriz en forma de gel, adaptada para una cromatografía de afinidad.

10 Se describen unas matrices en las que la densidad de ligandos, es decir la cantidad de ligandos (a saber de oligosacáridos que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A o B) injertados, por volumen de matriz, está comprendida entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,7 mg/ml de matriz.

15 La matriz de cromatografía de afinidad según la invención tiene una densidad de oligosacáridos comprendida entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 0,4 mg/ml de matriz. Preferentemente, la densidad de oligosacáridos es de aproximadamente 0,3 mg/ml de matriz.

20 Según la invención, esta densidad permite disminuir de manera drástica el tiempo de purificación por cromatografía de afinidad, por comparación con una densidad de 1 mg/ml (por ejemplo sobre gel GLYCOSORB ABO® de Glycorex Transplantation AB (Suecia), mencionado en la solicitud WO2007/077365). El volumen de matriz puede aumentarse y el caudal a través de la columna de cromatografía puede aumentarse. Así, con una densidad de ligandos de 0,3 mg/ml de matriz (comparada con una densidad de 1 mg/ml), la duración del procedimiento se ha dividido por 2, lo que, a escala industrial, representa un ahorro destacable. De manera ventajosa, la disminución de la densidad de ligandos permite también disminuir el coste de la matriz, y hace así la etapa de afinidad sobre la matriz según la invención menos costosa, contribuyendo a bajar el precio de fabricación de la composición de inmunoglobulinas final. Ventajosamente, la disminución de la densidad de ligandos se acompaña de una conservación de la capacidad de
25 eliminación de los anticuerpos anti-A y/o anti-B.

30 En un modo de realización preferido, las partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y las partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B, pueden después mezclarse, por ejemplo en una proporción de 25/75 a 75/25 (v/v), preferentemente aproximadamente 50/50 (v/v).

35 Las partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y las partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B, pueden también, llegado el caso, mezclarse a unas partículas de polímero que llevan al mismo tiempo al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B.

Cromatografía de afinidad:

40 La matriz tal como se define aquí es útil en una cromatografía de afinidad que enlaza anticuerpos anti-A y/o anti-B.

45 Por esta razón, la matriz puede introducirse en una columna de cromatografía. A escala industrial, la columna puede contener de 1 a 150 litros, incluso de 250 a 500 l, si fuese necesario. En el caso de una realización a escala piloto, se pueden utilizar unas columnas de 1 a 50 cm de altura, el diámetro se adapta entonces a la altura de columna utilizada. El volumen de matriz utilizado en la columna se ajusta en función del porcentaje residual en anticuerpo anti-A y/o anti-B deseado con respecto a los porcentajes de anticuerpo anti-A y/o anti-B inicial de la solución. El volumen de matriz puede también ajustarse para responder a las obligaciones de un procedimiento industrial, especialmente adaptarse a los volúmenes de producto a tratar.

50 Los anticuerpos anti-A y/o anti-B presentes en la preparación líquida de inmunoglobulinas (o el derivado de productos sanguíneos), se fijan a la matriz, y el producto no absorbido se recupera, empobrecido de anticuerpo anti-A y/o anti-B. La preparación líquida de inmunoglobulinas o el derivado de productos sanguíneos se vierte a través de la matriz a una velocidad y en condiciones que permiten el enlace de los anticuerpos con los ligandos llevados por la matriz.

55 Las matrices pueden reutilizarse de manera repetida, por ejemplo hasta 100 veces aproximadamente, sin degradación. Su regeneración se puede realizar mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo por tratamiento por sosa (NaOH), por ejemplo a 1 M. La reutilización después de la regeneración responde a las exigencias de seguridad de un procedimiento industrial de fabricación de medicamentos, especialmente a las necesidades de descontaminación biológica y a la eliminación de trazas de producto que puede inducir a una contaminación lote a lote. La reutilización de la matriz de afinidad permite también ventajosamente bajar el precio de fabricación industrial durante la fabricación de inmunoglobulinas.

65 La matriz de afinidad según la invención es perfectamente adecuada, por lo tanto, para una utilización industrial para la fabricación de medicamentos tales como las inmunoglobulinas, permitiendo una eliminación robusta y suficiente de los anticuerpos anti-A y/o anti-B inicialmente presentes en la solución, sin aumentar de manera drástica el precio de fabricación industrial del producto de inmunoglobulinas final.

Purificación de los productos de inmunoglobulinas:

5 Una cromatografía de afinidad que utiliza la matriz de la invención es particularmente ventajosa para purificar unas preparaciones o composiciones de inmunoglobulinas, eliminando los anticuerpos anti-A y/o anti-B indeseables eventualmente presentes en estas preparaciones o composiciones, y así preparar unos concentrados de inmunoglobulinas para uso terapéutico.

10 Por "eliminación" se entiende una reducción sustancial de la cantidad de anticuerpos anti-A y/o anti-B presentes, preferentemente de al menos un 25%, más preferentemente de al menos un 50%, aún más preferiblemente de al menos un 80 o un 90%. El concentrado de Ig de la invención obtenido después de la cromatografía de afinidad presenta unos contenidos respectivos en anticuerpos anti-A y anti-B conformes (a la dilución 1/64) a un resultado negativo al ensayo de Coombs directo realizado con una concentración inicial de IgG a 30 g/l. Preferentemente, el concentrado de Ig de la invención obtenido después de la cromatografía de afinidad comprende un contenido en anticuerpo anti-A no superior a 23 ng/mg de IgG, y un contenido en anticuerpo anti-B no superior a 20 ng/mg de IgG. 15 Unos métodos de evaluación de los anticuerpos anti-A y anti-B residuales se describen, especialmente, en la solicitud WO2007/077365. Preferentemente, un método de evaluación de los anticuerpos anti-A y anti-B se efectúa mediante una citometría de flujo, cuyo principio se basa en la utilización de hematíes humanos de grupo A o B, según la determinación del título de los anticuerpos anti-A y anti-B deseada, utilizando la detección de una señal de fluorescencia proporcional al contenido en estos anticuerpos. El método de evaluación por citometría de flujo utiliza generalmente una muestra estándar, por ejemplo un control positivo de inmunoglobulinas (tal como un título 1:32 de EDQM, ref nº 07/306; Thorpe *et al.*, 2009, Vox Sang. 97, 160-168), o un concentrado de anticuerpos anti-D monoclonal o cualquier otro producto de referencia adaptado.

25 Los productos de inmunoglobulinas contienen esencialmente unas IgG. Típicamente, estas IgG son unas IgG policlonales obtenidas a partir del plasma sanguíneo o de una fracción de plasma sanguíneo ya enriquecido en Ig.

Los concentrados de Ig de uso terapéutico están a concentraciones comprendidas entre 50 y 100 g/l. Estos concentrados están destinados a un uso clínico y pueden inyectarse, en particular, por vía intravenosa. Para ello, 30 deben asegurarse y, llegado el caso, contener unos excipientes, tales como unos estabilizantes, compatibles con este uso clínico.

Los concentrados de Ig de uso terapéutico pueden también administrarse por vía subcutánea. En este caso, la concentración de los productos es superior o igual a 100 g/l, ventajosamente superior o igual a 150 g/l. 35

Los concentrados de Ig de uso terapéutico pueden también administrarse por vía intramuscular.

Estos concentrados de Ig pueden obtenerse de la manera siguiente:

40 a) preparación de una composición de Ig, por ejemplo por fraccionamiento etanólico y/o por fraccionamiento caprílico y/o por separación cromatográfica,

b) cromatografía de inmuoafinidad por percolación de la composición de Ig sobre una matriz de la invención,

45 y c) etapa de securización biológica, preferentemente una nanofiltración para eliminar virus y/o partículas contaminantes.

La composición de Ig se puede obtener por un fraccionamiento etanólico desarrollado inicialmente por Cohn *et al.* (Cohn *et al.*, 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459; Oncley *et al.*, 1949, J. Am. Chem. Soc. 71, 541), o bien por una separación cromatográfica, tal como se describe por ejemplo en el documento EP 0 703 922 y WO 99/64462, o también por un fraccionamiento caprílico tal como se describe por Steinbuch *et al.*, 1969, Arch Biochem Biophys. 134(2):279-84). Se prefieren muy particularmente los procedimientos elaborados por la solicitante en las solicitudes de patente WO 94/29334 y WO 02/092632, y muy particularmente el descrito en el documento WO 02/092632. En este caso, se somete un plasma sanguíneo, o una fracción de plasma sanguíneo enriquecido en IgG, a un fraccionamiento caprílico (prepurificación por precipitación de contaminantes no inmunoglobulinas), una cromatografía única sobre un soporte de resina intercambiadora de aniones efectuada a pH alcalino, una elución selectiva de las IgG en una etapa por un tampón apropiado a pH comprendido entre 4 y 7. Puede realizarse un tratamiento de inactivación viral, preferentemente efectuado por disolvente-detergente, como se describe por Horowitz en la patente US 4 764 369. 50 55 60

La fracción de IgG así recogida está ya concentrada, pero puede sufrir después unas etapas de concentración suplementaria por ultrafiltración, y de filtración esterilizante.

65 Este concentrado se somete después a una etapa de cromatografía de inmuoafinidad sobre la matriz de la invención. Preferentemente, el pH de la preparación de inmunoglobulinas se ajusta a un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, preferentemente de aproximadamente 6, antes de la cromatografía.

La carga de la columna está adaptada al porcentaje residual buscado de anticuerpos anti-A y/o anti-B. La especificidad de tal matriz no necesita un acondicionamiento previo de la fracción de IgG, es decir que puede ser adecuado cualquier fracción o concentrado de IgG obtenida por las técnicas de fraccionamiento de plasma.

5 La percolación del concentrado no hace intervenir un mecanismo de elución. En consecuencia, sea cual sea la manera por la cual se obtiene el concentrado de IgG, se percola a través de la columna, eventualmente gracias a una bomba. Esta percolación permite la retención de los anticuerpos anti-A y anti-B. El tiempo de contacto entre los ligandos y la preparación de Ig es superior o igual a un minuto, ventajosamente del orden de 2 minutos.

10 La columna se puede lavar después por agua para recuperar las IgG todavía presentes en el volumen muerto de la columna.

15 Después de la percolación del concentrado de IgG, se obtiene una fracción de IgG empobrecida en anticuerpos anti-A y anti-B.

El procedimiento puede comprender después unas etapas de concentración por ultrafiltración y de filtración esterilizante.

20 La columna cromatográfica y la matriz pueden lavarse y eluirse después para desorber los anticuerpos anti-A y anti-B retenidos.

El ejemplo siguiente ilustra la presente invención, sin no obstante limitar su alcance.

25 **Ejemplo: Cromatografía de afinidad (escala industrial)**

Condiciones de cromatografía:

30 Una preparación de inmunoglobulinas, obtenida por fraccionamiento según el procedimiento descrito en la solicitud WO2002/092632, que comprende 10 ± 2 g/l de IgG, se somete, a escala industrial, a una etapa de cromatografía de afinidad anti-A/anti-B realizada sobre una columna que comprende una mezcla 50/50 (v/v) de perlas de celulosa reticulada sobre las cuales se injertan unos trisacáridos que corresponden a un epítipo del grupo sanguíneo A (N-acetilgalactosamina (GalNAc)-Galactosa(Gal)-Fucosa), como se representa en la figura 2 (gel designado "Iso A HyperCel"), y de perlas de celulosas reticulada sobre las cuales se injertan unos trisacáridos que corresponden a un epítipo del grupo sanguíneo B (Galactosa-Galactosa-Fucosa), como se representa en la figura 3 (gel designado "Iso BHyperCel").

Los trisacáridos se injertan con las perlas por un espaciador de fórmula:



La densidad de trisacáridos injertados es de 0,3 mg por ml de gel de matriz.

45 Para verificar la actividad residual anti-A y anti-B, la preparación de inmunoglobulinas designada Eluato (fracción obtenida después de la cromatografía intercambiadora de aniones), cuyo pH se ha ajustado a $6 (\pm 0,05)$ se ha pasado sobre una columna de 1 ml (que comprende 0,5 ml de gel Iso A HyperCel + 0,5 ml de gel Iso B HyperCel)

Formato de la columna: $D = 0,5 \text{ cm} \times 5,1 \text{ cm}$ (volumen de la columna (VC) = 1 ml).

50 Tiempo de contacto: 2 minutos

Carga: 6 g de preparaciones Eluato / mg de ligandos A+B, es decir 180 ml de producto por columna.

Antes del ensayo, el gel se lava con agua (10 VC mínimo).

55 Las condiciones de las diferentes etapas del procedimiento se resumen en la tabla siguiente:

Tabla de las etapas:

Etapa	Solución	Volumen
Saneado	NaOH IM (30min)	6VC
	Fosfato IM pH 8,0	4VC
Equilibrado	Agua PPI (Vuelta a pH neutro 5 a 7)	10VC

ES 2 793 176 T3

Fijación	Eluato	± 180ml
Recogida no fraccionada de la FNA		
Lavado	NaCl 150 mM + fosfato 15 mM pH 6,2	10VC
Elución ácida	Glicina 0,1M pH 3	6VC
Elución básica	Glicina 0,1M pH 11	6VC

VC: volumen columna; FNA: Fracción no absorbida

Se ha recogido una única fracción no absorbida (FNA).

5

Ensayos de evaluación:

10 El rendimiento se ha determinado por evaluación de las IgG en la fracción no adsorbida, después del lavado y de la percolación. La actividad residual anti-A y anti-B, que corresponde al porcentaje de isoaglutininas anti-A y anti-B presentes en la preparación final con respecto a su concentración antes de la etapa de cromatografía de afinidad, se ha medido por citometría de flujo (técnica más sensible y precisa que la de las diluciones solicitada por la Farmacopea Europea), según la técnica descrita a continuación.

15 Se han recogido unos glóbulos rojos de grupos A- y B- sobre EDTA y se han lavado dos veces en una solución de NaCl 0,9% (centrifugación a 1730 g durante 5 minutos entre los dos lavados). Se han distribuido $2 \cdot 10^6$ glóbulos rojos sobre una placa de microtitración y se han añadido 50 μ l de control positivo estándar (1:32 EDQM, ref nº 07/306; Thorpe *et al.* 2009) o las muestras diluidas a una concentración de trabajo (PBS pH 7,4, 1% BSA). Las placas se incubaron durante 2h a 37°C bajo agitación. Después del lavado, se ha utilizado un anticuerpo F(ab')² de carba anti-IgG humanas (Fc específico) (Beckman Coulter) marcado con ficoeritrina (PE) diluido al 1/20 en PBS-BSA. Las placas se han incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente y fuera de la luz.

20

Después del lavado, se ha resuspendido cada residuo en 200 μ l de PBS-BSA, y leído con el citómetro de flujo (Beckman Coulter Cytomics FC 500).

25 La intensidad media de fluorescencia (IMF) del control positivo se ha detallado en función de la concentración en IgG (curva estándar) para unas concentraciones que van de 0,23 g/l a 30 g/l. Los resultados se expresan como la relación entre la pendiente de la muestra y la pendiente del estándar positivo. La ecuación de la curva estándar es $y = ax + b$; en la que "a" es el valor del pendiente de la curva estándar y "b" el punto cero que corresponde al ruido de fondo del ensayo. Como la ecuación de la muestra es $y' = a'x + b$, y utilizando los valores conocidos de IMF de la muestra (y') y la concentración en IgG (x'), la relación de las pendientes se ha calculado como siendo $[(IMF-b)/[IgG \text{ concentración}]]/a$.

30

Resultados:

El rendimiento en IgG y la actividad residual anti-A y anti-B obtenidos se presentan en la tabla siguiente:

35

Tabla de los resultados:

	Vol (ml)	Conc. (g/l) IgG	Cantidad (g) IgG	Carga g/mg ligandos gel A+B	Citómetro cálculo IgG Anti-A Act. resid	Citómetro cálculo IgG Anti-B Act. resid
Principio	180,0	11,60	2,1	6,8	5,14	3,44
FNA	183,8	11,10	2,0		0,60	0,29
Lavado + E + R	18,8	1,20	0,0		12%	8%

40 Los resultados de esta tabla muestran un rendimiento en IgG del 98% en la fracción no adsorbida, lo que provoca que el soporte de afinidad presenta una buena especificidad frente a isoaglutininas anti-A y anti-B.

40

Los resultados de esta tabla muestran también una reducción importante de la actividad residual anti-A y anti-B, que son respectivamente del 12% y del 8%. El producto así obtenido es entonces conforme (a la dilución 1/64) a un resultado negativo al ensayo de Coombs direct utilizado con una concentración inicial de IgG a 30 g/l.

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Matriz de cromatografía de afinidad, en forma de gel, que comprende unas partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A y/o de grupo B, injertándose dicho oligosacárido a dichas partículas por medio de un espaciador, caracterizada por que la densidad de oligosacáridos es de aproximadamente 0,3 a 0,4 mg/ml de matriz y dicho espaciador consiste en un espaciador de fórmula $-\text{NH}-\text{C}_5\text{H}_{10}-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}_3\text{H}_6-$, enlazándose dicho espaciador a la partícdcula mediate su función amina.
- 10 2. Matriz según la reivindicación 1, que comprende (i) unas partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y/o (ii) unas partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B.
- 15 3. Matriz según la reivindicación 2, que comprende (i) unas partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y (ii) unas partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo de grupo sanguíneo B.
- 20 4. Matriz según la reivindicación 1, que comprende unas partículas de polímero sobre las cuales se injertan al mismo tiempo al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B.
- 25 5. Matriz según la reivindicación 1, que comprende una mezcla de (i) partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, (ii) partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B, y (iii) partículas de polímero sobre las cuales se injertan al mismo tiempo al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B.
- 30 6. Matriz según una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la densidad de oligosacáridos es de aproximadamente 0,3 mg/ml de matriz.
- 35 7. Matriz según una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A y/o el oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B es un trisacárido.
8. Matriz según la reivindicación 7, en la que el oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A es un trisacárido N-acetilgalactosamina (GalNAc)-Galactosa (Gal)-Fucosa.
- 40 9. Matriz según la reivindicación 7, en la que el oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B es un oligosacárido Galactosa-Galactosa-Fucosa.
- 45 10. Matriz según la reivindicación 3, en la que las partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo A, y las partículas de polímero sobre las cuales se injerta al menos un oligosacárido que corresponde a un epítipo de grupo sanguíneo B, se mezclan en una proporción de 25/75 a 75/25 (v/v), preferentemente de aproximadamente 50/50 (v/v).
- 50 11. Matriz según una de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el polímero es un polímero reticulado, preferentemente celulosa, y las partículas son preferentemente unas perlas de celulosa porosas.
- 55 12. Utilización de la matriz según una de las reivindicaciones 1 a 11, en una cromatografía de afinidad que enlaza unos anticuerpos anti-A y/o anti-B, preferentemente para la producción a escala industrial de inmunoglobulinas G (IgG) de uso terapéutico.
13. Procedimiento de preparación de un concentrado de inmunoglobulinas G (IgG) de uso terapéutico, que comprende la obtención de una composición de Ig a partir de plasma sanguíneo, por fraccionamiento etanólico y/o fraccionamiento caprílico y/o separación cromatográfica, y la eliminación de los anticuerpos anti-A y/o anti-B eventualmente presentes en la composición, mediante una cromatografía de afinidad que utiliza la matriz según una de las reivindicaciones 1 a 11.

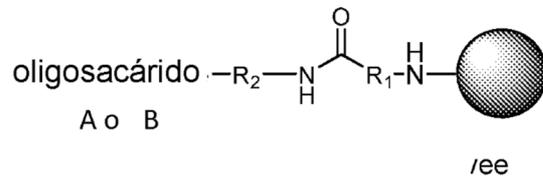


FIGURA 1

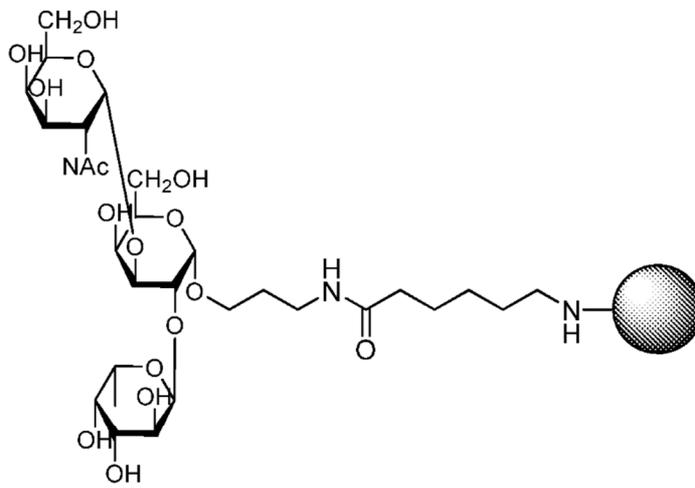


FIGURA 2

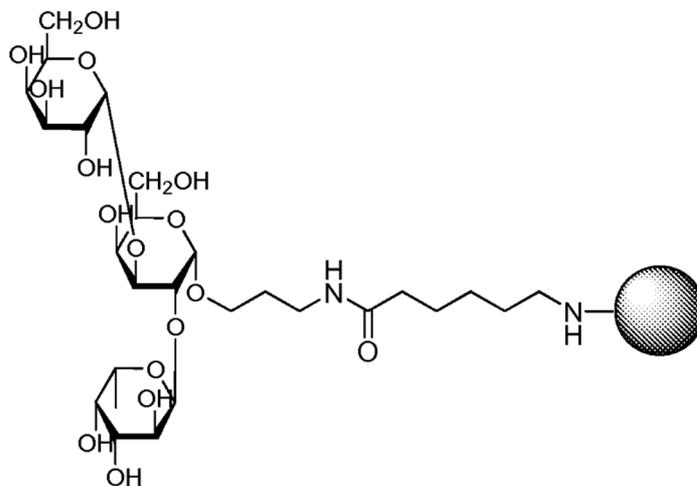


FIGURA 3

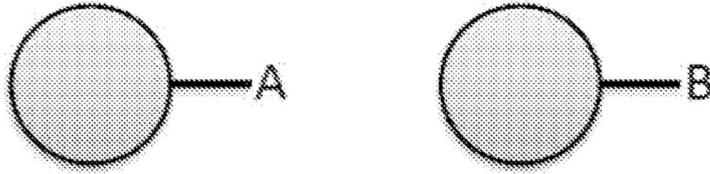


FIGURA 4A

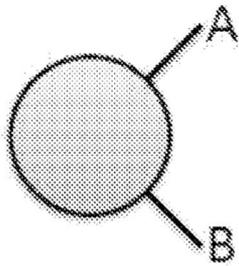


FIGURA 4B

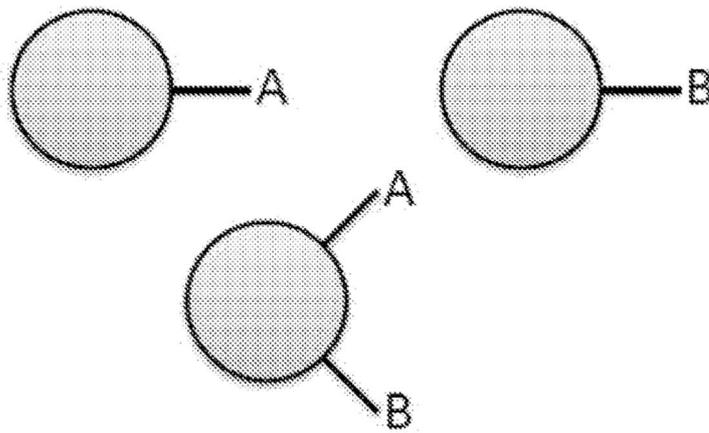


FIGURA 4C