

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 380**

51 Int. Cl.:

C07K 16/06 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2005 PCT/EP2005/050812**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.09.2005 WO05082937**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2005 E 05716804 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **25.01.2017 EP 1718675**

54 Título: **Procedimiento para proporcionar una preparación de anticuerpos purificada, sin riesgo respecto a virus**

30 Prioridad:

27.02.2004 US 548107 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
07.07.2017

73 Titular/es:

**OCTAPHARMA AG (100.0%)
SEIDENSTRASSE 2
8853 LACHEN, CH**

72 Inventor/es:

**BUCHACHER, ANDREA;
IBERER, GÜNTHER y
RÖMISCH, JÜRGEN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para proporcionar una preparación de anticuerpos purificada, sin riesgo respecto a virus

La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar una preparación de anticuerpos purificada, sin riesgo respecto a virus, a partir de una solución de partida que comprende anticuerpos y contaminantes. Describe un procedimiento de purificación de gammaglobulinas de plasma humano y de otras fuentes. Las etapas de inactivación y eliminación de virus se incluyen en el procedimiento de fabricación descrito en el presente documento.

Precipitación y eliminación/inactivación del virus resultante

En la década de los años 40, Cohn y col. introdujeron el fraccionamiento del plasma humano con etanol frío. Para aumentar la pureza y/o el rendimiento de los distintos productos intermedios surgieron varias variaciones de este esquema. En el fraccionamiento de Cohn se identificaron algunas etapas para contribuir eficazmente a la inactivación y eliminación de virus. En el procedimiento de IgG, en especial la separación de la fracción I+III de Cohn es muy eficaz a este respecto. Algunos virus sensibles (principalmente los virus con envoltura) se destruyen por el pH bajo y la presencia de EtOH, y una gran parte de los virus con envoltura y sin envoltura se eliminan mediante la separación en el precipitado I+III, que por lo general se desecha.

En la década de los años 60, se mostró que los ácidos grasos cortos (C6-C12) forman complejos insolubles con α - y β -globulinas, mientras que las γ -globulinas no precipitan con tanta facilidad (Chanutin y col., 1960). Steinbruch y col. (1996) describieron un procedimiento de purificación para IgG con caprilato (es decir, octanoato, un ácido graso saturado en C8) como agente de precipitación. Se precipitaron componentes del plasma humano distintos de inmunoglobulinas después de la dilución con un tampón de acetato para alcanzar un pH final de 4,8. Después de la adición de caprilato con agitación vigorosa se obtuvo una solución enriquecida en IgG. La pureza y el rendimiento dependen de la cantidad de ácido caprílico, del pH, de la molaridad del tampón y del factor de dilución. Steinbruch y col. también afirmaron que es ventajoso añadir la cantidad eficaz de caprilato en dos etapas, con la eliminación de los precipitados entremedio. Los virus sin envoltura y con envoltura se eliminan mediante separación en el precipitado de las proteínas que no son IgG como es el caso de la separación de la fracción I+III.

Cromatografía

Varias patentes describen la purificación de una solución de IgG en el denominado modo negativo; la IgG atraviesa, sin unirse (solo en trazas), mientras que la mayoría de las proteínas de la fracción no IgG se unen a los ligandos aniónicos (Bertolini y col. 1998, documento WO-A-98/05686; Lebing 1999, documento US-A-5.886.154; Friesen y col., 1986, documento CA 1201063). La combinación de la precipitación con caprilato seguida por cromatografía de intercambio iónico para la purificación de IgG se describió en muchas publicaciones. Una de las primeras la escribieron Steinbuch y col. (1969). Ellos describen la purificación adicional de IgG después de la precipitación de caprilato con DEAE-celulosa. La reciente publicación de Lebing y col. (2003) describe dos columnas de intercambio aniónico utilizadas en serie para la eliminación de IgM, IgA, albúmina y otras impurezas. Lebing y col. combinaron ambos efectos mediados por el caprilato, a saber, la reducción esencial de las proteínas no IgG por precipitación, utilizando de ese modo la separación de virus, y las propiedades de inactivación de los virus con envoltura del ácido graso en una etapa de incubación distinta. Se destaca como esencial la importancia de la denominada "oscilación de pH", Lebing y col. (2003), a partir de la reconstitución de una pasta/precipitado que contiene IgG a pH 4,2 y la posterior adición de caprilato tras ajustar el pH a 5,2, para el procedimiento de enriquecimiento de IgG, siendo por lo tanto necesaria para reducir de forma eficaz las proteínas que no son IgG. Algunas otras impurezas, tales como IgA e IgM, así como el caprilato, se redujeron posteriormente por medio de las etapas de cromatografía de intercambio iónico mencionadas.

Sorprendentemente, los inventores encontraron que tal cambio de pH como se describe anteriormente y descrito por Lebing y col. no es necesario para lograr un efecto de purificación significativo tras la adición caprilato y la eliminación del precipitado resultante. En su lugar, al mantener el pH constante a pH 4,6 hasta 4,95 durante todo el procedimiento de reconstitución de la pasta, la incubación con caprilato y la eliminación del precipitado, se consigue un enriquecimiento de IgG eficaz. También se reduce la cantidad de impurezas de manera más eficaz, especialmente albúmina, manteniendo el pH constante a 4,9. Al mismo tiempo, se eliminan los virus. Posteriormente se separan las impurezas residuales y el caprilato mediante etapas de intercambio iónico.

Inactivación clásica de virus

Los tratamientos con detergente disolvente y pH 4 son procedimientos muy conocidos y ampliamente utilizados para las inmunoglobulinas. El tratamiento con DD se introduce normalmente en estos procedimientos debido a su superioridad en términos de inactivación de los virus con envoltura (Biesert L. Clinical and Experimental Rheumatology 1996; 14: 47). Tanto los virus con envoltura como los sin envoltura se ven afectados por la exposición a pH bajo, aunque los virus con envoltura se ven más afectados que los que no tienen envoltura (Biesert. Clinical and Experimental Rheumatology 1996, 14: 47, Bos y col. Biologicals 1998; 26: 267, en Seop y col. J Microbiol Biotechnol 2001; 11: 619).

En el documento EP-A-0 525 502 se describe la combinación de detergente disolvente y la incubación a pH 4 como etapas de inactivación de virus.

Filtración de virus

- 5 Para aumentar la seguridad con respecto a los virus, las soluciones de IgG se filtran a través de membranas de tamaño de poro muy pequeño (normalmente de 15 a 50 nm) en condiciones que retienen los virus por un mecanismo a base, en gran medida, de exclusión por tamaño (Burnouf y Radosevich. Haemophilia 2003; 9: 24). Para la filtración de las inmunoglobulinas también se utilizan filtros de profundidad diseñados para retener los virus por adsorción de intercambio iónico.

Sumario de la invención

- 10 La invención describe un procedimiento de purificación de IgG con un rendimiento aumentado y un menor tiempo de procedimiento en comparación con el procedimiento de fraccionamiento clásico de Cohn-Onclly. Se reconstituye la IgG en tampón a un intervalo de pH ácido de 4,60 hasta 4,95, preferentemente de 4,9. Las proteínas que no son IgG se separan mediante dos etapas de incubación con caprilato en un intervalo de concentraciones de caprilato de 10 a 30 mM, preferentemente 20 mM.
- 15 Para la inactivación eficaz de los virus con envoltura, se puede añadir una incubación conocida como tratamiento con detergente disolvente con Triton X-100, Tween 80 etc. y TNBP, para aumentar la capacidad de inactivación de virus de todo el procedimiento. Se puede añadir a los procedimientos de eliminación de virus una eliminación de virus por filtración, véase a continuación, mediante los denominados filtros de nanofiltración o de profundidad cargados. Además, también se puede realizar un tratamiento con UVC en combinación con los tratamientos
- 20 mencionados anteriormente. Tales tratamientos se describen, por ejemplo, en los documentos EP-A-0 840 624 o EP-A-0 422 007.

Además, el caprilato/ácido caprílico se puede combinar con o sustituir por heptanoato/ácido heptanoico para realizar la precipitación anteriormente mencionada y las etapas del procedimiento de incubación.

- 25 El producto que se puede obtener por el procedimiento de la invención está inactivado con respecto a los virus. Los priones también se inactivan/eliminan debido al tratamiento con caprilato.

Las figuras 1 y 2 representan un diagrama de flujo de realizaciones particulares del procedimiento de la invención.

Descripción detallada de la invención

- 30 La invención se refiere a un procedimiento para preparar una preparación de anticuerpos purificada, con virus inactivado y sin riesgo respecto a virus, a partir de una solución de partida que comprende anticuerpos y contaminantes, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- (a) ajustar el pH de la solución de partida a 4,6 hasta 4,95, en particular a 4,8 hasta 4,95, para producir una solución intermedia;
- (b) añadir iones caprilato y/o heptanoato a la solución intermedia y mantener a 4,9, con lo que se forma un precipitado y los anticuerpos están esencialmente presentes en el sobrenadante;
- 35 (c) incubar la solución de sobrenadante tras una segunda adición de iones caprilato y/o heptanoato en la misma condición que en la etapa b), la filtración de la solución resultante y, opcionalmente, concentrar y diafiltrar la solución filtrada antes de ajustar el pH;
- (d) aplicar la solución filtrada en al menos una resina de intercambio aniónico a un pH desde 5,0 hasta 5,2 y, opcionalmente, con dos resinas de intercambio aniónico distintas en condiciones que permitan la unión de los
- 40 contaminantes a la resina mientras no permiten una unión significativa de los anticuerpos a la resina, en el que se produce una preparación de anticuerpos purificada, con virus inactivado y sin riesgo respecto a virus.

- Si se realizan dos cromatografías de intercambiador aniónico, la segunda cromatografía se puede realizar en un intervalo de pH desde 6,7 hasta 6,9. Opcionalmente se pueden repetir las etapas (b) y (c) al menos una vez. El tratamiento con caprilato a un pH de 4,9 conduce a un empobrecimiento significativo de proteínas no deseadas.
- 45 Típicamente, la solución de partida comprende anticuerpos derivados de plasma.

Puede ser ventajoso poner en contacto en la etapa (d) la solución inactivada con dos resinas de intercambio aniónico distintas en condiciones tales que los contaminantes se unan selectivamente a las resinas mientras que los anticuerpos no se unen significativamente a las resinas.

Preferentemente, los anticuerpos son del tipo de inmunoglobulina G.

- 50 Entre las dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico (IA) se puede cambiar el pH, en particular, hasta 6,8 $\pm$ 0,1. El flujo de paso de la IA puede concentrarse hasta 60 a 90 mg/ml y diafiltrarse frente a, por ejemplo tampón de fosfato. En otra realización del procedimiento de la invención, el flujo de paso de la primera IA se trata con detergente disolvente, preferentemente mediante Triton X-100 y TnBP, preferentemente en concentraciones de Triton X-100 al 1 % y TnBP al 0,3 % durante 4,5 a 8 horas, para inactivar los virus con cubierta lipídica. El

procedimiento se conoce como tratamiento con detergente-disolvente, y desvela en el documento EP-A-0 131 740 (incorporado por referencia). De acuerdo con la invención, los detergentes de la mezcla de incubación se eliminan, en particular, mediante extracción en fase sólida y líquida. Después de la extracción en fase sólida se ajusta el pH de la solución a entre 6,7 y 6,9. La combinación del tratamiento con D/D y la inactivación de virus con caprilato conducen a un producto más seguro.

La solución así ajustada se puede aplicar a la segunda columna de IA, donde se puede ajustar el pH del flujo de paso de la IA por ejemplo a 3,5 hasta 4,5, en particular a $4,0 \pm 0,1$. De acuerdo con la invención, la solución de IgG con pH ajustado se pone en contacto con un filtro de virus. Esta etapa opcional conduce, en combinación con el tratamiento con caprilato, a una mayor seguridad con respecto a virus.

La solución de IgG también se puede incubar a $37^\circ\text{C} \pm 1$ durante al menos 24 horas. Para mejorar la seguridad del producto de anticuerpos con respecto a virus, se puede combinar el tratamiento con UV-C con el tratamiento con caprilato de la fracción que contiene los anticuerpos. Los procedimientos de inactivación solos o en combinación, tales como el tratamiento con TnBP, el tratamiento con UV-C, la filtración de virus o el calentamiento, se pueden combinar con el procedimiento de la invención.

El procedimiento de acuerdo con la invención se puede combinar con procedimientos para la eliminación o la inactivación de priones, por ejemplo, procedimientos de filtración o adsorción, o procedimientos cromatográficos como se desvela en la técnica anterior, por ejemplo, en el documento EP-A-0 954 528, Trejo, S. R. y col., Vox Sanguinis, (2003) 84,176 - 187. La solución de IgG obtenida de acuerdo con la invención se concentra debido al uso terapéutico previsto, típicamente hasta concentraciones del 5 o el 10 %, y la osmolaridad del concentrado se ajusta a de 200 a 400 mOsmol/kg, mediante de un aditivo apropiado. Sin embargo, cualquier otro valor es posible siempre que sea farmacéuticamente aceptable. Tales aditivos son muy conocidos para el experto e incluyen, pero sin limitación, azúcares, polioles y aminoácidos. Se puede ajustar el pH de la solución de IgG a 3,5 hasta 6,0, en particular de 4,0 hasta 5,5. Por último, la solución de IgG se esteriliza por filtración y se llenan con ellas frascos de vidrio o recipientes de plástico. Como alternativa, el flujo de paso tras la primera o segunda etapa de IA se aplica a nanofiltros para conseguir un producto aún más seguro.

El procedimiento de la invención se describe con más detalle, se realiza preferentemente como se indica:

Como material de partida se utilizó fracción I+II+III o fracción II+III de plasma humano. Estas fracciones se produjeron como describen Cohn y col. (1946). El ajuste del pH durante el procedimiento se realizó con ácido acético 1 M, NaOH 0,1 M o HCl 0,3 M. Se añadió caprilato como una solución madre de caprilato de sodio 1 M. Esta solución madre se preparó disolviendo 166 g de caprilato de sodio en 1 litro de agua para inyecciones (API) y agitando hasta la disolución total del caprilato de sodio.

Se utilizaron a modo de ejemplo Triton X-100 y TnBP para el tratamiento con DD. Para la eliminación de los reactivos DD se utilizaron aceites vegetales, tales como aceite de soja o aceite de ricino.

Todos los reactivos eran de calidad USP o superior.

Se utilizaron cromatografía de exclusión por tamaño cuantitativa y ELISA para determinar la concentración de IgG. Se realizó HPLC analítica con un sistema de HPLC de Agilent con una columna TosoHaas G3000SW.

En la figura 1 se muestra un dibujo esquemático del procedimiento. El procedimiento comienza con la disolución del precipitado de IgG, llamado pasta, en agua purificada. Habitualmente, cuanto mayor es el volumen de agua para reconstituir la pasta, mayor es el rendimiento de IgG. El pH de la solución se ajusta a 4,60 hasta 4,95, preferentemente 4,90, con ácido acético 1 M. La solución se agita durante varias horas para obtener la mayor cantidad posible de IgG en solución. Después se añade caprilato como una solución madre 1 M hasta concentraciones de entre 10 y 30 mM, preferentemente caprilato 20 mM. Durante la adición del caprilato se mantiene el pH constante a 4,90. Durante la incubación de la solución de IgG con caprilato precipitan las proteínas que no son IgG y los lípidos. El precipitado formado se elimina por filtración de la solución de IgG. Después de la primera etapa de precipitación permanecen en la solución de IgG algunas impurezas. Por lo tanto, es necesario un segundo tratamiento con caprilato. De manera similar a la primera etapa, se añade el caprilato como una solución madre 1 M hasta una concentración de caprilato aproximadamente 20 mM en solución, a un pH constante de 4,9. Después de la incubación se elimina el precipitado por filtración o por centrifugación. Para lograr un mejor rendimiento se utiliza durante la filtración un auxiliar para filtro. Se ajusta el pH de la solución filtrada a un pH entre 5,0 y 5,2, preferentemente a 5,1 y se aplica a una columna de intercambio aniónico. Como columna de intercambio aniónico, se eligieron preferentemente intercambiadores aniónicos fuertes, tales como Q-Sepharose FF, Q-Sepharose-HP, Q-Sepharose-XL, Source Q 15 o 30 (Amersham Bioscience), Q-Thruput, Q-Thruput plus (Sterogene), Macro Prep Q y Macro Prep High Q (Bio-Rad), Q Hyper D (BioSeptra) y Poros HQ (PerSeptive Biosystems).

La IgG fluye a través de la columna en las condiciones elegidas, mientras que algunos aditivos/impurezas, tales como el caprilato y la IgA, se unen a la resina. La solución de proteínas se carga en la columna en una proporción de 40 a 120 mg, en particular de 40 a 90 mg de proteína por ml de resina. El flujo de paso obtenido se concentra hasta una concentración de proteína de 60 a 90 mg/ml, preferentemente de 70 mg/ml, y se somete a diafiltración

frente a 5 volúmenes de tampón de fosfato con una concentración de 5 a 20 mM, preferentemente de 10 mM. Como una etapa de inactivación de virus opcional se puede elegir el tratamiento con DD después de la diafiltración. Después, se inactivan los virus de la solución diafiltrada utilizando el tratamiento con DD descrito por Horowitz, por ejemplo, en el documento EP-A-0 131 740. Como reactivos de DD se utilizaron TnBP y Tritón X-100. Después de 5 agitar, la solución se incubaba hasta 8 horas a una temperatura de entre 4 y 10 °C. Después, se añade a la solución un aceite vegetal tal como aceite de soja o aceite de ricino, preferentemente aceite de ricino, hasta una concentración del 3 al 5 % (p/p). Después de la separación de la fase oleosa de la fase acuosa, se filtra la fase acuosa. Por lo tanto, se utiliza un filtro de profundidad apropiado. Ejemplos de estos filtros son Polysep II (Millipore), Sartofine PP y Sartobran P (Sartorius). La posterior extracción en fase sólida se realiza de un modo preferente utilizando medios de 10 soporte hidrófobos que también se utilizan en la cromatografía de fase inversa, con una matriz de gel fabricada a base de sílice, estireno-co-divinilbenceno (SDVB), glicidil metacrilato-co-etileno dimetacrilato o poliaromático. Ejemplos de estos medios son μ bondapak (Waters), Amberchrom CG-161 M y S, Amberchrom CG-070 (Tosoh Biosep), PLRP-S (Polymer Laboratories), RPC-1 y Toyopearl Hexyl 650C (Tosoh Biosep), Source 15 RPC (Amersham Biosciences), LiChroprep Si60 (Merck), Chromabond Sorbent HR-P y EASY (Machery-Nagel), 15 ProntoSORB SPE (Bischoff Chrom.). La solución de proteínas se carga en la columna en una proporción de 0,5 a 1,5 mg/ml de resina seca. El flujo de paso de la extracción en fase sólida (o de la etapa de cromatografía, respectivamente) se trata con UVC y después se ajusta a un pH de entre 6,7 y 6,9, preferentemente de 6,8, por la adición de NaOH 0,1 M, a una temperatura de entre 4 y 10 °C. Después, se aplica la solución de IgG a una segunda columna de intercambio aniónico. La IgG fluye a través sin quedar retenida en la columna, mientras que las 20 impurezas y los polímeros se unen a la columna. Como columna de intercambio aniónico, se eligieron preferentemente intercambiadores aniónicos fuertes, tales como Q-Sepharose-FF, Q-Sepharose-HP, Q-Sepharose-XL, Source Q 15 o 30 (Amersham Bioscience), Q-ThruPut, Q-ThruPut plus (Sterogene), Macro Prep Q y Macro Prep High Q (Bio-Rad), Q Hyper D (BioSeptra) y Poros HQ (PerSeptive Biosystems). La columna se equilibra con un tampón de fosfato de sodio 10 mM. Después de la aplicación de la solución de IgG, se lava la columna con tampón 25 de equilibrado para obtener de la columna toda la IgG no unida. La solución de proteínas se carga en la columna en una proporción de 120 a 300 mg de proteína/ml de resina. Se ajusta el pH de la solución de IgG recogida a entre 3,9 y 4,1, preferentemente a 4,0, con HCl 0,3 M, a una temperatura de entre 4 y 10 °C. Después, se filtra la solución de manera estéril y se almacena a 37 °C durante al menos 24 horas. Con posterioridad al tratamiento a pH bajo, se ajusta el pH de la solución a 4,7 con NaOH 0,1 M, a una temperatura de entre 4 y 10 °C. Como una etapa de 30 reducción de virus adicional se pueden utilizar filtros para virus apropiados. Para la filtración de virus, la solución de IgG se filtró a través de un filtro de 0,1 μ m, seguido de filtros para virus con un tamaño de poro de entre 200 y 15 nm. Ejemplos de estos filtros son DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 75, 35, 20, 15 N (Asahi Kasei Pharma). También se puede utilizar un filtro de profundidad cargado como Zeta Plus VR (Cuno). Esta etapa de filtración también se puede aplicar después de la incubación a pH 4. Preferentemente, esta etapa se 35 lleva a cabo en el procedimiento antes del tratamiento a pH bajo. La solución de IgG altamente purificada se somete a diafiltración y se concentra hasta los valores finales de la formulación. Como concentraciones finales para una formulación líquida se eligieron concentraciones de proteína del 5 o del 10 % (p/v). Después de la concentración se ajusta la osmolaridad para que sea compatible para la inyección intravenosa mediante un aditivo apropiado. Se pueden utilizar azúcares, políoles y aminoácidos. Se comprueba nuevamente el pH y se ajusta a entre 4,5 y 5,0, 40 preferentemente a 4,7. Posteriormente, se lleva a cabo otra filtración de manera estéril y se llenan frascos de infusión con la solución.

Los siguientes ejemplos explican el procedimiento de la invención con más detalle:

Ejemplo 1:

Se disolvió la fracción de Cohn I+II+III o II+III en 12 volúmenes de agua, se ajustó el pH a 4,9 con ácido acético 1 M 45 y se agitó la solución durante hasta 5 horas hasta que la mayor parte de la IgG se disolvió a una temperatura de 2 a 8 °C. A continuación, se añadió el caprilato como solución madre de caprilato de sodio 1 M a la solución de IgG hasta una concentración de caprilato 20 mM, manteniendo el pH constante en 4,9 mediante la adición de ácido acético 1 M. Esta solución se agitó durante una hora. En estas condiciones precipitaron los lípidos y las impurezas, y se eliminaron por filtración. A continuación se añadió caprilato a la solución nuevamente, hasta una concentración de 50 20 mM en solución manteniendo el pH constante en 4,9. Una vez más se generó un precipitado y se eliminó por filtración. Después de la filtración se obtuvo una solución transparente. Se ajustó el pH de la solución a 5,1 con NaOH 0,1 M, a una temperatura de 7 ± 3 °C y se aplicó a la columna Source Q 30. La solución de IgG fluyó a través de la columna mientras que las impurezas y el caprilato se unieron a la columna. La solución de IgG recogida se concentró hasta una concentración de proteínas de 70 mg/ml y se sometió a diafiltración frente a 5 volúmenes de un 55 tampón de fosfato de pH 5,1. Posteriormente, se añadieron a la solución TnBP al 0,3 % (p/p) y Triton X-100 al 1 % (p/p), seguido de agitación vigorosa. Después de al menos 4,5 horas de agitación a 7 ± 3 °C, se añadió aceite de ricino al 5 % (p/p). La extracción con aceite se realizó a temperatura ambiente. Se separaron las fases oleosa y acuosa y la fase acuosa se filtró con un filtro Opticap Polysep de Millipore. La solución filtrada se aplicó a una columna rellena con una matriz de fase inversa denominada μ Bondapak (Waters). Después, se ajustó el pH de la 60 solución a 6,8 con NaOH 0,1 M, a una temperatura de 7 ± 3 °C y se aplicó a un intercambiador aniónico fuerte, concretamente Q-Sepharose-XL. La IgG pasó a través de la columna mientras que las impurezas se unieron a la columna. El pH de la solución de IgG recogida se ajustó a 4,7 con NaOH 0,1 M, a una temperatura de 7 ± 3 °C. Una vez más, se llevó a cabo una ultrafiltración para ajustar la concentración de proteínas a la concentración final de 50 o

100 mg/ml, seguido de la adición de maltosa a un intervalo de concentraciones del 2 al 10 % (en peso), preferentemente del 8 % o de glicina en un intervalo de concentraciones de 0,1 a 0,5 M, en particular de 0,1 a 0,3 M, preferentemente 0,3 M, en particular 0,2 M. Posteriormente a la siguiente filtración estéril, se llenaron frascos de infusión esterilizados y siliconados con distintos volúmenes de la solución (50, 100, 200 ml). Los frascos se sellaron mediante tapones.

Ejemplo 2:

Este ejemplo en particular se diferencia del ejemplo 1 por la implementación de una etapa de incubación a pH 4. Se disolvió la fracción de Cohn I+II+III o II+III en 12 volúmenes de agua, se ajustó el pH a 4,9 con ácido acético 1 M y la solución se agitó durante hasta 5 horas hasta que la mayor parte de la IgG se disolvió, a una temperatura de 2 a 8 °C. A continuación, se añadió caprilato como una solución madre de caprilato de sodio 1 M a la solución de IgG hasta una concentración de caprilato 20 mM en solución y se mantuvo el pH constante en 4,9 mediante la adición de ácido acético 1 M. Esta solución se agitó durante una hora. En estas condiciones los lípidos y las impurezas precipitaron y se eliminaron por filtración. A continuación, se añadió nuevamente caprilato a la solución hasta una concentración de 20 mM manteniendo el pH constante en 4,9. Una vez más el precipitado formado se eliminó por filtración. Después de la filtración se obtuvo una solución transparente. La solución de IgG recogida se concentró hasta una concentración de proteínas de 70 mg/ml y se sometió a diafiltración frente a 5 volúmenes de un tampón de fosfato de pH 5,1. Se ajustó el pH de la solución a 5,1 con NaOH 0,1 M, a una temperatura de 7 ± 3 °C, y se aplicó al intercambiador aniónico fuerte Q-Sepharose-XL. La IgG fluyó a través de la columna mientras que las impurezas y el caprilato se unieron a la columna. Posteriormente, se añadieron a la solución TnBP al 0,3 % (p/p) y Triton X-100 al 1 % (p/p), seguido de agitación vigorosa. Después de al menos 4,5 horas de agitación a de 4 a 10 °C, se añadió aceite de ricino al 5 % (p/p). La extracción con aceite se realizó a temperatura ambiente. Se separaron las fases oleosa y acuosa, y la fase acuosa se filtró con un filtro Opticap Polysep de Millipore. La solución filtrada se aplicó a una columna rellena con Amberchrom CG-161M. Después, se ajustó el pH de la solución a 6,8 con NaOH 0,1 M, a una temperatura de 7 ± 3 °C y se aplicó al intercambiador aniónico fuerte Q-Hyper D. La IgG fluyó a través de la columna mientras que las impurezas se unieron a la columna. El pH de la solución de IgG recogida se ajustó a 4,0 con HCl 0,3 M, a una temperatura de 7 ± 3 °C. La solución se filtró de manera estéril y se almacenó a 37 ± 3 °C durante al menos 24 horas. A continuación, se ajustó el pH de la solución a 4,7 con NaOH 0,1 M, a una temperatura de 7 ± 3 °C. Una vez más, se llevó a cabo una ultrafiltración para ajustar la concentración de proteínas a la concentración final de 50 o 100 mg/ml a obtener tras la formulación con maltosa o glicina. Posteriormente a la siguiente filtración de manera estéril, se llenaron frascos de infusión esterilizados y siliconados con distintos volúmenes de la solución (50, 100, 200 ml). Los frascos se sellaron mediante tapones.

Ejemplo 3:

Este ejemplo en particular se diferencia de las anteriores muestras por la concentración de la solución de IgG hasta una concentración de proteína de 70 mg/ml antes de la primera etapa de IA y por la implementación de una etapa de nanofiltración.

Se disolvió la fracción de Cohn I+II+III o II+III en 12 volúmenes de agua, se ajustó el pH a 4,9 con ácido acético 1 M y la solución se agitó durante hasta 5 horas hasta que la mayor parte de la IgG se disolvió a una temperatura de 2 a 8 °C. A continuación, se añadió caprilato como una solución madre de caprilato de sodio 1 M a la solución hasta una concentración de caprilato 20 mM en solución, y se mantuvo el pH constante en 4,9 mediante la adición de ácido acético 1 M. Esta solución se agitó durante una hora. En estas condiciones precipitaron los lípidos y las impurezas y se eliminaron por filtración. A continuación, se añadió nuevamente caprilato a la solución hasta una concentración de 20 mM manteniendo el pH constante en 4,9. Una vez más se generó un precipitado y se eliminó por filtración. Después de la filtración se obtuvo una solución transparente. La solución de IgG recogida se concentró hasta una concentración de proteínas de 70 mg/ml y se sometió a diafiltración frente a 5 volúmenes de un tampón de fosfato de pH 5,1. Se ajustó el pH de la solución a 5,1 con NaOH 0,1 M, a una temperatura de 7 ± 3 °C, y se aplicó a un intercambiador aniónico fuerte. La IgG fluyó a través de la columna mientras que las impurezas y el caprilato se unieron a la columna. Después, se ajustó el pH de la solución a 6,8 con NaOH 0,1 M, a una temperatura de 7 ± 3 °C y se aplicó a un segundo intercambiador aniónico fuerte. La IgG pasó a través de la columna mientras que las impurezas se unieron a la columna. Se ajustó el pH de la solución de IgG recogida a 4,0 con HCl 0,3 M, a una temperatura de 7 ± 3 °C. La solución se filtró a través de un filtro de 0,1 μ m, a continuación se utilizó una cascada de filtros PALL, concretamente PALL DVD, DV 50 y DV 20, con tamaños de poro hasta llegar a 20 nm, para la nanofiltración. La solución nanofiltrada se almacenó a 37 ± 3 °C durante al menos 24 horas. A continuación, se ajustó el pH de la solución a 4,7 con NaOH 0,1 M, a una temperatura de 7 ± 3 °C. Una vez más, se llevó a cabo una ultrafiltración para ajustar la concentración de proteínas a la concentración final de 50 o 100 mg/ml a obtener tras la formulación con maltosa o glicina mediante la adición de maltosa o glicina. Posteriormente a la siguiente filtración de manera estéril, se llenaron frascos de infusión esterilizados y siliconados con distintos volúmenes de la solución (50, 100, 200 ml). Los frascos se sellaron mediante tapones.

Ejemplos comparativosProcedimiento de la invención

Se reconstituyen aproximadamente 310 g de Fracción I+II+III (incluyendo los auxiliares de filtración) en 12 volúmenes de API calculados a partir del peso teórico de la fracción I+II+III, sin auxiliares de filtración. La solución se agita durante 1 hora a 5 °C. Después, se ajusta el pH a $4,9 \pm 0,1$ (aprox. 950 g). Se continúa con la reconstitución durante 2 horas a 5 °C. Después, se obtiene la muestra "Fracción I+II+III reconstituida". Se añade una solución de caprilato 1 molar hasta alcanzar una concentración de 20 mM. El pH se mantiene constante en 4,9. La solución se incuba durante 1 hora a 5 °C. La solución se filtra a través de un filtro de profundidad y una hoja de papel a 5 °C (aprox. 1050 g). Posteriormente se lava el filtro con una solución de cloruro de sodio 10 mM. Se calienta el filtrado a 25 °C, se añade el caprilato 1 molar hasta alcanzar una concentración de 10 mM adicional. La solución se incuba durante 1 hora a 25 °C. Se centrifuga la solución y se filtra el sobrenadante a través de un filtro (1110 g) que tiene un tamaño de poro de 1 μm y 0,5 μm . Se obtiene la muestra "después del caprilato".

Según el documento EP 0 893 450

Se reconstituyen aproximadamente 310 g de Fracción I+II+III (incluyendo los auxiliares de filtración) en 7 volúmenes de API calculados a partir del peso teórico de la fracción I+II+III, sin auxiliares de filtración. La solución se agita durante 1 hora a 5 °C. Se ajusta el pH a $4,1 \pm 0,1$. Se continúa con la reconstitución durante 2 horas a 5 °C. Después, se obtiene la muestra "Frac. I+II+III rec.". Se añade una solución de caprilato 1 molar hasta alcanzar una concentración de 20 mM. El pH cambia a 4,9 tras la adición de caprilato y se ajusta a 5,1. La solución se incuba durante 1 hora a 5 °C. La solución se filtra a través de un filtro de profundidad y una hoja de papel a 5 °C. Posteriormente se lava el filtro con una solución de cloruro de sodio 10 mM (aprox. 1050 g). Se calienta el filtrado a 25 °C, se añade el caprilato 1 molar hasta alcanzar una concentración de 10 mM adicional. La solución se incuba durante 1 hora a 25 °C. Se centrifuga la solución y se filtra el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 μm (aprox. 1110 g). Se obtiene la muestra "después del caprilato".

Empobrecimiento de albúmina e IgA

Experimento	Muestras	Invención pH 4,9	documento EP 0 893 450 5,1
		Albúmina [IgG $\mu\text{g}/\text{mg}$]	Albúmina [IgG $\mu\text{g}/\text{mg}$]
1	Fr. I+II+III rec.	27,1	32,9
	después del caprilato	0,2	10,2
2	Fr. I+II+III rec.	44,2	32,6
	después del caprilato	0,2	2,2
3	Fr. I+II+III rec.	30,2	31,2
	después del caprilato	0,8	9,9
4	Fr. I+II+III rec.	22,7	33,1
	después del caprilato	0,9	10,7
	Fr. I+II+III rec. promedio	31,1	32,5
	Fr. I+II+III rec. desv. típica	9,3	0,9
	después del caprilato promedio	0,5	8,3
	después del caprilato desv. típica	0,4	4,0
Experimento	Muestras	IgA	IgA
		[IgG $\mu\text{g}/\text{mg}$]	[IgG $\mu\text{g}/\text{mg}$]
1	Fr. I+II+III rec.	86	106
	después del caprilato	40,9	49,3
2	Fr. I+II+III rec.	74,3	120,7
	después del caprilato	23,7	60,5
3	Fr. I+II+III rec.	88,5	114
	después del caprilato	30,8	56,9
4	Fr. I+II+III rec.	115,5	113,6
	después del caprilato	34,4	51,3
	Fr. I+II+III rec. promedio	91,1	113,6

(continuación)

		Invención pH 4,9	Documento EP 0 893 450 5,1
Experimento	Muestras	Albúmina	Albúmina
	Fr. I+II+III rec. desv. típica	17,4	6,0
	después del caprilato promedio	32,5	54,5
	después del caprilato desv. típica	7,2	5,1

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de una preparación de anticuerpos purificada, con virus inactivado y sin riesgo respecto a virus, a partir de una solución de partida que comprende anticuerpos y contaminantes, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 5 (a) ajustar el pH de la solución de partida a 4,6 hasta 4,95, en particular a 4,8 hasta 4,95, para producir una solución intermedia;
- (b) añadir iones caprilato y/o heptanoato a la solución intermedia y mantener el pH a 4,9, con lo que se forma un precipitado y los anticuerpos están presentes en el sobrenadante;
- 10 (c) incubar la solución de sobrenadante tras una segunda adición de iones caprilato y/o heptanoato en las mismas condiciones que en la etapa b), la filtración de la solución resultante y opcionalmente concentrar y someter a diafiltración la solución filtrada antes del ajuste del pH;
- (d) aplicar la solución filtrada a, al menos, una resina de intercambio aniónico a un pH desde 5,0 hasta 5,2 y, opcionalmente, con dos resinas de intercambio aniónico distintas, que une los contaminantes a la resina mientras no permite la unión de los anticuerpos a la resina, en el que se produce una preparación de anticuerpos purificada, con virus inactivado y sin riesgo respecto a virus.
- 15

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se realiza una segunda cromatografía de intercambio aniónico a un intervalo de pH desde 6,7 hasta 6,9.

3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 y/o 2, en el que las etapas (b) y (c) se repiten al menos una vez.

20 4. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la solución de partida comprende anticuerpos derivados de plasma.

5. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 4, en el que en la etapa (d) se pone en contacto la solución inactivada con dos resinas de intercambio aniónico distintas, de manera que los contaminantes se unen de forma selectiva a las resinas mientras que los anticuerpos no se unen a las resinas.

6. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los anticuerpos son inmunoglobulinas G.

25 7. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el pH se ajusta a $\text{pH } 6,8 \pm 0,1$ antes de la segunda cromatografía de intercambio aniónico.

8. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el flujo de paso de la cromatografía de intercambio aniónico se concentra a 60 hasta 90 mg/ml y se somete a diafiltración frente a una solución tamponadora, preferentemente un tampón de fosfato.

30 9. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el flujo de paso de la primera cromatografía de intercambio aniónico se trata con detergente disolvente, preferentemente por Triton X-100 y TnBP, muy preferentemente por concentraciones de Triton X-100 al 1 % y TnBP al 0,3 %, durante 4,5 a 8 horas, para inactivar los virus con cubierta lipídica.

35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que los detergentes de la mezcla de incubación se eliminan mediante extracción en fase sólida y líquida.

11. El procedimiento de al menos una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que al menos uno de los procedimientos seleccionado del grupo que consiste en tratamiento con UV-C, tratamiento con calor, filtración de virus y eliminación o inactivación de priones, se combina con un tratamiento con caprilato de la reivindicación 1.

40 12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el valor del pH tras la extracción en fase sólida se ajusta a 6,7 hasta 6,9.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la solución es sometida a la segunda cromatografía de intercambio aniónico.

14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el valor del pH del flujo de paso del intercambiador aniónico se ajusta a 3,5 hasta 4,5, preferentemente a $\text{pH } 4,0 \pm 0,1$.

45 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la solución de IgG se pone en contacto con un filtro de virus.

16. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la solución de IgG se pone en contacto con un nanofiltro.

17. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la solución de IgG se incuba durante al menos 24 horas, preferentemente a $37^\circ\text{C} \pm 1$.

18. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la solución de IgG se concentra al 5 o el 10 %.

50

19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la osmolaridad del concentrado se ajusta a 200 hasta 400 mOsmol/kg.
20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que el pH de la solución de IgG se ajusta a 3,5 hasta 6,0, preferentemente a un valor de pH de 4,0 hasta 5,5.
- 5 21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que la solución de IgG se filtra de manera estéril y se rellena en frascos de vidrio o recipientes de plástico.

Figura 1

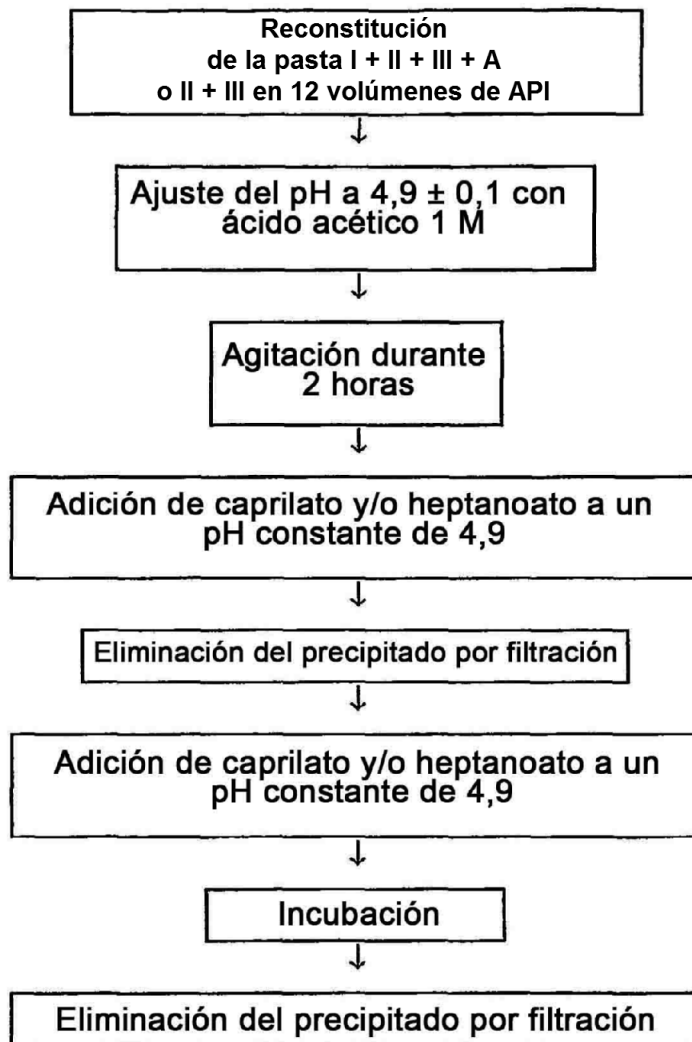
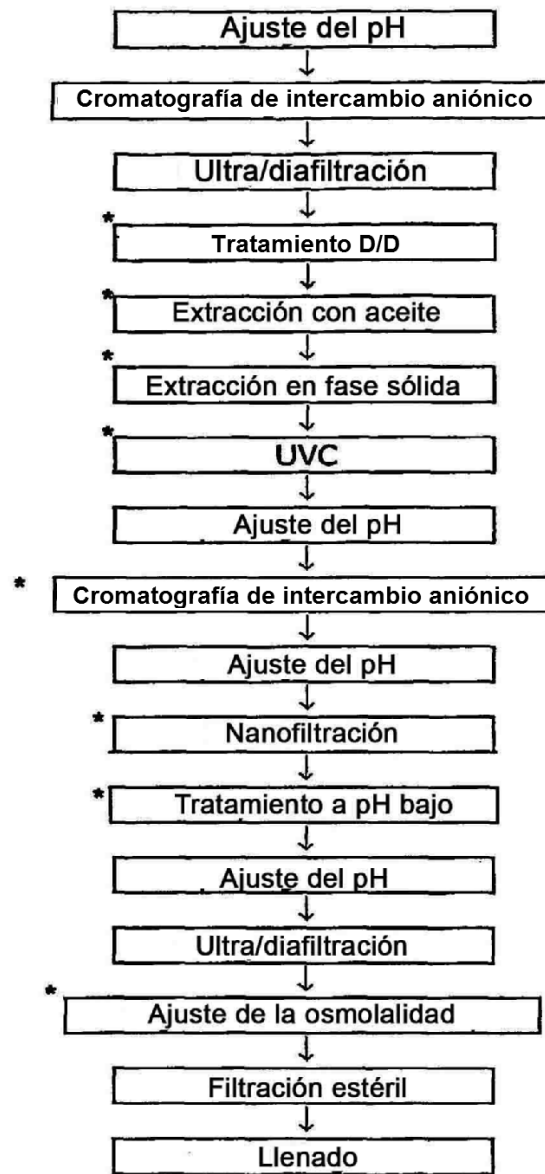


Figura 2



Todos los recuadros con un asterisco son etapas opcionales del procedimiento.