

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 553 385**

(51) Int. Cl.:

**A61L 2/10** (2006.01)  
**C07K 16/06** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2011 E 11715928 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2560691**

---

(54) Título: **Proceso para preparar una composición de inmunoglobulina**

(30) Prioridad:

**22.04.2010 GB 201006753**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.12.2015**

(73) Titular/es:

**BIOTEST AG (100.0%)  
Landsteinerstr. 5  
63303 Dreieich, DE**

(72) Inventor/es:

**MÖLLER, WOLFGANG;  
RUDNICK, DIETER;  
MANEG, OLIVER;  
RODEMER, MICHAEL;  
DICTHELMUELLER, HERBERT y  
FLECHSIG, ECKHARD**

(74) Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 553 385 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**

Proceso para preparar una composición de inmunoglobulina

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de una composición de inmunoglobulina segura contra virus, y a preparaciones de anticuerpos y composiciones farmacéuticas que se pueden preparar utilizando el proceso.

**10 Antecedentes de la invención**

Se conocen en la técnica composiciones de inmunoglobulinas preparadas a partir de plasma humano y adecuadas para la administración intravenosa y han jugado durante varias décadas un importante papel en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades. Las inmunoglobulinas se utilizan, por ejemplo, en el tratamiento de infecciones en seres humanos y se pueden asignar a varias clases con diversas propiedades bioquímicas y fisiológicas. La inmunoglobulina G participa en la defensa contra antígenos víricos, mientras que IgM es predominantemente activa en las respuestas inmunes antibacterianas y antitoxinas.

**20** Las soluciones de inmunoglobulinas comprenden IgG, IgA e IgM en diversos porcentajes, con diferentes preparaciones que tienen diferentes aplicaciones de tratamiento, por ejemplo, se usan preparaciones con un mayor porcentaje de IgM en la profilaxis o el tratamiento de infecciones bacterianas. A diferencia de las preparaciones de IgG, los anticuerpos IgM se agregan fácilmente en solución. Las preparaciones de IgM son difíciles de estabilizar especialmente si están enriquecidas en comparación con las concentraciones plasmáticas y se almacenan en solución líquida.

**25** Las soluciones de inmunoglobulinas se preparan usualmente a partir de fracciones de plasma o suero sanguíneo, por ejemplo, fracciones de Cohn. Estas fracciones se someten a continuación a numerosas etapas de purificación para eliminar contaminantes entre los que se incluyen virus, proteínas desnaturizadas, proteasas y lípidos. El plasma humano para fraccionamiento se recoge a partir de miles de donantes y puede contener virus patógenos a pesar de someter a ensayo totalmente la fuente de plasma. Por tanto, son esenciales las etapas de proceso para inactivar o eliminar virus a fin de conseguir productos seguros para el uso en medicina. Se conocen en la materia algunas técnicas para la inactivación/eliminación vírica, por ejemplo, tratamientos clínicos, irradiación con UVC luz o filtración nanométrica, que se llevan a cabo para garantizar la seguridad total del virus. Sin embargo, dichas etapas pueden tener un impacto negativo sobre la actividad de las inmunoglobulinas; por ejemplo, tiempos de irradiación prolongados con UVC pueden reducir el rendimiento de la IgM natural activa en la solución final de inmunoglobulina.

**30** La capacidad de las etapas de proceso para la eliminación o inactivación vírica se valida usando modelos a escala laboratorio del proceso de producción y para cada etapa se determina un factor de eliminación o inactivación. Un aumento del factor de eliminación / inactivación proporciona seguridad vírica adicional al producto farmacéutico. Actualmente, las directrices de los organismos reguladores requieren al menos dos etapas eficaces contra los virus con envoltura y sin envoltura en la fabricación de compuestos farmacéuticos derivados de plasma.

**35** En adición a los virus que están potencialmente presentes, es también necesario eliminar otros contaminantes como proteasas, agregados de proteínas, e inmunoglobulinas desnaturizadas, para conseguir un producto bien tolerado. Las inmunoglobulinas desnaturizadas son especialmente un riesgo potencial para los pacientes debido a que tienen una elevada capacidad de activar de forma inespecífica el complemento, dando lugar a graves efectos secundarios en pacientes que reciben estas inmunoglobulinas desnaturizadas. Esta actividad anticomplementaria (ACA) se mide mediante un ensayo normalizado descrito en Farmacopea Europea.

**40** La eliminación de todos estos contaminantes es esencial (1) para que el producto sea bien tolerado por el paciente tras la administración intravenosa, (2) para asegurar que el producto cumple con las directrices de bioseguridad relativas a la contaminación vírica, (3) para permitir que el producto sea estable durante el almacenamiento a largo plazo, y (4) para generar la mezcla de compuesto / composición farmacéutica deseada.

**45** Se ha llevado a cabo la purificación inicial de soluciones de IgM humanas mediante métodos clásicos de fraccionamiento de plasma de Cohn con alcohol frío o sus modificaciones bien conocidas (por ejemplo, Cohn/Oncley, Kistler/Nitschmann). Mediante el uso de procesos de precipitación con etanol frío, se recupera la fracción de IgM en la fracción III o la fracción I/III (denominada también B o B+I). Se han descrito métodos que, partiendo de la fracción III o I/II, purifican soluciones de proteínas enriquecidas en IgM. El documento EP0013901 describe un método de purificación que parte de la fracción III incluyendo etapas que utilizan ácido octanoico, β-propiolactona y una etapa de adsorción que utiliza una resina de intercambio aniónico. Este método se utiliza para producir Pentaglobin® -hasta la fecha, el único producto de IgM intravenoso comercialmente disponible. El documento EP0352500 describe la preparación de un concentrado de IgM para su aplicación intravenosa con una actividad anticomplementaria reducida utilizando la cromatografía de intercambio aniónico, β-propiolactona, irradiación con luz ultravioleta y una etapa de incubación a temperatura elevada (40 °C a 60 °C). β-propiolactona es

- un compuesto químico bien conocido utilizado en las etapas de esterilización para inactivar virus que están potencialmente presentes. Como la  $\beta$ -propiolactona es una sustancia muy reactiva que produce la modificación química de las proteínas, se produce también una pérdida sustancial de las actividades antivíricas y antibacterianas de las inmunoglobulinas. La preparación producida mediante este método era estable en solución líquida durante un tiempo limitado debido a la modificación química. La concentración de IgM estaba por encima del 50 % del contenido total de inmunoglobulina.
- Se ha descrito la preparación de soluciones de proteína enriquecidas en IgM sin modificación química mediante la  $\beta$ -propiolactona en los documentos EP0413187 (Bioteest) y EP0413188 (Bioteest). Estos métodos implican someter una solución de proteína adecuada a tratamiento con ácido octanoico y cromatografía de intercambio aniónico, partiendo de la fracción III o II/III de Cohn. En la patente EP0413187 (Bioteest) el tratamiento con ácido octanoico se lleva a cabo agitando durante 15 min, para eliminar los lípidos que están presentes en la fracción III de Cohn.
- Puesto que se administran a los pacientes grandes cantidades de inmunoglobulinas por vía intravenosa, debe conseguirse una preparación farmacéutica que sea tolerable. Se ha descrito que las preparaciones de IgM son difíciles de preparar para aplicación intravenosa. IgM es por naturaleza un intenso activador del complemento tras la unión de los antígenos. Por tanto, la actividad anticomplementaria inespecífica de las moléculas de IgM desnaturalizadas es mucho más peligrosa para los pacientes que las moléculas de IgG desnaturalizadas. La preparación de acuerdo con el documento EP0413187 tuvo una baja actividad anticomplementaria, entre 0,6 y 0,8 CH50/mg de proteína, pero tuvo que estabilizarse, e inactivarse los virus mediante la  $\beta$ -propiolactona. La baja actividad anticomplementaria se considera que es  $\leq 1$  CH50/mg de proteína de acuerdo con la monografía de la EP sobre inmunoglobulinas.
- El documento EP0413188B1 (Bioteest) describe la preparación de una preparación enriquecida en IgM para administración intravenosa utilizando cromatografía de intercambio aniónico para reducir la actividad anticomplementaria. Adicionalmente se ha descrito un tratamiento térmico a pH 4 - 4,5 a 40 a 60 °C, preferentemente entre 50 y 54 °C, para reducir la actividad anticomplementaria. Esta preparación debe liofilizarse para garantizar la estabilidad de la preparación durante varios meses. No se pudo demostrar la estabilidad a largo plazo en forma de solución líquida.
- Otro método describe el uso de un tratamiento térmico suave de las preparaciones de IgM a 40 a 62 °C, preferentemente de 45 a 55 °C, a pH 4,0 a 5,0 (documento EP 0450412, Miles) para reducir la actividad no específica del complemento. En esta solicitud de patente se añade ácido octanoico a la suspensión de la fracción III de Cohn a fin de eliminar el activador precalicreína y las lipoproteínas mediante centrifugación. Sin embargo, este tratamiento ocasiona la pérdida parcial de los determinantes antigenicos de IgM. Esto puede aumentar el riesgo de generar nuevos antígenos que conduce a un aumento de la inmunogenicidad en seres humanos o a la pérdida de la actividad.
- Se ha descrito la preparación de una solución de proteína que contiene IgM para la aplicación intravenosa utilizando un tratamiento con proteasa (por ejemplo, con pepsina) tras una etapa de precipitación con ácido octanoico en el documento EP0835880 (US 6136312, ZLB). El tratamiento con proteasa conduce a la fragmentación parcial de la molécula de inmunoglobulina, lo que afecta negativamente a la actividad funcional completa de las partes Fab y Fc. Por tanto, las inmunoglobulinas tratadas con proteasa no se pueden considerar como no modificadas. Análogamente, este método de preparación conduce a aproximadamente un 5 % de fragmentos con un peso molecular de <100 kD.
- Los métodos descritos para llevar a cabo el tratamiento con ácido octanoico (documentos EP0413187 y EP0835880) tienen el inconveniente de que el tratamiento con ácido octanoico no es eficaz con respecto a la eliminación y a la inactivación de virus sin envoltura, y no elimina sustancialmente toda la actividad proteolítica.
- En el documento EP 0345543 (Bayer, Miles) se describe una preparación de IgM muy concentrada con al menos un 33 % de IgM para uso terapéutico, estando la preparación sustancialmente exenta de títulos de isoaglutinina. En esta solicitud de patente se lleva a cabo una precipitación con ácido octanoico añadiendo el ácido octanoico y se eliminan las isoaglutininas mediante cromatografía de afinidad Synsorb. La preparación final se debe criodesecada.
- En conjunto, es posible preparar una preparación que contiene IgM con una baja actividad anticomplementaria si las inmunoglobulinas están químicamente o enzimáticamente modificadas y/o purificadas adicionalmente mediante cromatografía y/o sometidas a un tratamiento térmico suave.
- Sin embargo, los métodos de la técnica anterior que dan lugar a una preparación de inmunoglobulina sin modificar no pueden conseguir la capacidad de inactivación vírica para todos los virus que pueden estar potencialmente presentes. Aunque algunos métodos, tales como el tratamiento con disolvente/detergente, tratamiento con ácido octanoico, filtración nanométrica y tratamiento térmico, son eficaces para inactivar o eliminar los virus con envolturas, existen solo unos pocos métodos conocidos para inactivar o eliminar los virus sin envoltura, por ejemplo los parvovirus. Estos virus sin envoltura son principalmente muy pequeños, usualmente pasan a través de los filtros nanométricos con tamaños de poro superior a 20 nm. Este tamaño de poro es demasiado pequeño para moléculas

de IgM que tienen un diámetro de hasta 30 nm. Los virus sin envoltura se inactivan eficazmente mediante agentes químicos del tipo  $\beta$ -propiolactona que, sin embargo, conducen también a una inmunoglobulina modificada con funciones afectadas. Otro tratamiento eficaz es la irradiación con UVC (documento EP1842561, CAF-DCF). Sin embargo, los tratamientos conocidos con disolventes/detergentes, el tratamiento con ácido octanoico y los tratamientos térmicos suaves no tienen sustanciales efectos sobre los virus sin envoltura.

Por tanto, todas las preparaciones que contienen IgM sin modificar químicamente que se preparan por los métodos de la técnica anterior, y que tienen una baja actividad anticomplementaria, no son seguros para uso humano con respecto a los virus sin envoltura, por ejemplo, los parvovirus.

En resumen, los métodos de la técnica anterior que aislan preparaciones que contienen una IgM tolerable para administración intravenosa tienen determinados inconvenientes, tales como incapacidad de inactivar o eliminar eficazmente los virus sin envoltura y una capacidad limitada para eliminar la actividad proteolítica manteniendo a la vez un elevado rendimiento en solución de la IgM. (La actividad proteolítica se refiere a la suma de las proteasas que están presentes en la preparación). Puesto que una preparación de proteína líquida debe poderse almacenar durante largos períodos (por ejemplo, 2 años), deben omitirse las actividades de las proteasas residuales, dado que estas actividades deben conducir a la degradación de la preparación farmacéutica.

De esta manera, es el objeto de la presente invención resolver estos inconvenientes.

## **Sumario de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de inmunoglobulina IgM a partir de una fracción de plasma que comprende inmunoglobulinas, comprendiendo el proceso:

- (a) proporcionar una fracción plasmática en forma de solución que contiene las inmunoglobulinas;
- (b) mezclar un ácido carboxílico  $C_7$  a  $C_9$  con la solución y tratar la solución mezclada con un agitador vibrador para precipitar las proteínas contaminantes; y
- (c) separar las proteínas precipitadas a partir de la solución para dar como resultado la composición de inmunoglobulina que contiene la IgM.

Los presentes solicitantes han encontrado, de forma sorprendente que el uso de un agitador vibrador en la etapa donde la solución de inmunoglobulina se mezcla con el ácido carboxílico es extremadamente ventajosa. Esta etapa del método proporciona una eliminación más eficaz de proteínas no deseadas (incluyendo las proteasas) y produce un producto intermedio que es más adecuado para las etapas de procesamiento posteriores utilizadas para producir un medicamento de inmunoglobulina; el producto intermedio permite que estas etapas de procesamiento posteriores sean más eficaces. En particular, la composición que contiene la inmunoglobulina IgM obtenida a partir de la etapa (c) se puede combinar con etapas de tratamiento adicionales, tal como el tratamiento en condiciones ácidas suaves y tratamiento con irradiación UVC, para producir un producto de inmunoglobulina que contiene IgM o una preparación de anticuerpos que es adecuada para su administración intravenosa y que tiene las siguientes propiedades ventajosas: (i) está químicamente sin modificar; (ii) es segura contra virus (iii) tiene baja actividad proteolítica (y por tanto es estable durante el almacenamiento a largo plazo); (iv) tiene baja actividad anticomplementaria; y (V) retiene un elevado nivel de IgM natural y activa. El nivel de la seguridad contra el virus conseguido con los métodos descritos en el presente documento no se ha obtenido anteriormente. Además, el uso del método de la presente invención consigue un producto de inmunoglobulina o una preparación de anticuerpos que contiene IgM con combinaciones de estas características que no se han obtenido previamente.

En particular, las etapas del método de la presente invención conducen a una mayor inactivación y eliminación de partículas víricas, especialmente muy resistentes, virus sin envoltura tales como parvovirus, que no suelen ser muy susceptibles al tratamiento con ácido octanoico. Además, se consigue una eliminación mejorada de la actividad proteolítica en comparación con la agitación convencional. Estas características se consiguen manteniendo a la vez un elevado rendimiento de la IgM que está químicamente sin modificar. Este hallazgo contrasta con la visión convencional de que el tratamiento con ácido octanoico no es una etapa eficaz frente a virus sin envoltura y se puede conseguir una seguridad vírica mejorada mediante la inactivación de virus mediante métodos rigurosos tales como el tratamiento con  $\beta$ -propiolactona. Análogamente, es bien sabido que aumentar, por ejemplo, la concentración de ácido octanoico para eliminar completamente la actividad proteolítica da como resultado una pérdida masiva de IgM.

Los resultados de la presente invención se consiguen mediante el uso de dispositivos de mezcla que utilizan un modo vibrador en combinación con el tratamiento con ácido octanoico. Esto es particularmente sorprendente ya que se sabe que la IgM es muy susceptible al esfuerzo de cizalladura, que puede conducir a una actividad anticomplementaria muy indeseada. De acuerdo con ello, se podría considerar no utilizar un mezclador vibrador para preparar una composición de IgM y no se esperaría dicho impacto favorable utilizando un mezclador vibrador durante el procesamiento de una solución que contiene IgM.

Además, con el método de la presente invención, la separación se consigue en la etapa (c), dicha clarificación mediante filtración de la solución tratada con ácido octanoico resultante de la etapa (b) queda potenciada cuando se usa un dispositivo mezclador vibrador. La separación se consigue más fácilmente, reduciendo el tiempo de procesamiento y los costes de fabricación, y la etapa (c) conduce a una solución limpia que resulta una ventaja para el procesamiento posterior. Las soluciones convencionales, conseguidas filtrando los resultados de las soluciones que contienen IgM tratadas con ácido octanoico que se han agitado, son opalescentes u opacas.

La composición que contiene IgM resultante obtenida de la etapa (c) se somete preferentemente a tratamiento en condiciones ácidas suaves (por ejemplo, pH 4) y una etapa de irradiación UVC para mejorar la seguridad contra el virus y estabilizar el producto final. Debido a la clarificación mejorada de la composición de inmunoglobulina que contiene IgM obtenida de la etapa (c) es posible disminuir el tiempo de irradiación necesario con UVC para conseguir la inactivación vírica de los virus sin envoltura de más de 3 o 4 log<sub>10</sub>. Esto da como resultado un mayor rendimiento de la IgM natural y activa durante el tratamiento con UVC.

Sorprendentemente, estas etapas conducen a una solución que contiene IgM sin modificar ni químicamente ni enzimáticamente que tiene mayor rendimiento de la IgM natural y activa, que tiene baja actividad anticomplementaria y baja actividad proteolítica y que tienen elevada actividad antivírica y antibacteriana, con una seguridad notable en lo que respecta a virus con y sin envoltura; un rasgo clave de las sustancias farmacéuticas previstas para administración intravenosa. Además, una solución que contiene IgM tratada tiene una estabilidad a largo plazo mejorada, siendo muy estable en solución líquida durante más de 12 meses a 2 - 8 °C.

De acuerdo con ello, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona una preparación de anticuerpos que se puede obtener utilizando el proceso de la presente invención que se muestra anteriormente. La preparación de anticuerpos es adecuada para su administración intravenosa a seres humanos y comprende anticuerpos IgG, IgA e IgM, donde al menos un 5 % de las inmunoglobulinas totales son IgM. En un aspecto, la presente invención proporciona una preparación de anticuerpos que comprende inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM, donde al menos un 15 % de las inmunoglobulinas totales son IgM, donde la preparación de anticuerpos es segura contra virus con respecto a los virus con envoltura y sin envoltura, tiene una actividad anticomplementaria de ≤ 1 CH 50/mg de proteína, y es estable en forma líquida durante al menos 6 meses cuando se almacena de 2 a 8 °C. La preparación tiene preferentemente una actividad proteolítica inferior a 8 U/l.

Además, la presente invención proporciona una preparación de anticuerpos de la presente invención para uso en medicina. En una realización, la preparación de anticuerpos es para uso en el tratamiento de trastornos inmunológicos y las infecciones bacterianas.

Un aspecto adicional de la presente invención es el uso de una preparación de anticuerpos de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos inmunológicos e infecciones bacterianas.

La preparación de anticuerpos de la presente invención es adecuada para su uso en un método de tratamiento que comprende administrar la preparación de anticuerpos de la presente invención a un paciente.

La presente invención se describirá ahora más detalladamente por medio de ejemplos solamente, con referencia a las figuras que la acompañan.

La FIGURA 1 proporciona una visión general de una realización de la invención donde se muestran las etapas que se pueden utilizar para formar una preparación de anticuerpos adecuada para la administración intravenosa. La etapa de tratamiento con ácido octanoico emplea un dispositivo vibromezclador, se resaltan el tratamiento a pH 4 y el tratamiento con UVC. El material de partida se genera a partir de un proceso de precipitación con etanol frío normalizado de plasma humano.

#### **50 Descripción detallada de la invención**

Tal como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de una composición de inmunoglobulina que contiene IgM a partir de una fracción de plasma que comprende inmunoglobulinas. Son bien conocidas en la materia las fracciones plasmáticas adecuadas para la preparación de composiciones farmacéuticas de inmunoglobulina, y los métodos para su producción. En particular, donde las composiciones farmacéuticas de inmunoglobulina son para su administración a seres humanos, la fracción de plasma se obtiene a partir de plasma humano. La fracción plasmática es preferentemente una fracción plasmática precipitada y lo más preferible una fracción plasmática precipitada obtenida mediante el proceso de fraccionamiento de Cohn o sus modificaciones bien conocidas (por ejemplo, Kistler-Nitschmann). Lo más preferible, la fracción es una fracción I/III o una fracción III (conocida también como fracción B+I o fracción B) en un fraccionamiento en etanol frío. Se prefiere que las inmunoglobulinas de la fracción plasmática comprendan al menos un 5 % de IgM.

La etapa (a) comprende proporcionar una fracción plasmática en forma de solución que contiene las inmunoglobulinas. En muchos casos, la fracción plasmática que contiene las inmunoglobulinas estará en forma sólida o semisólida. De esta manera, el objetivo de esta etapa es asegurar a o poner la proteína de la fracción

plasmática en solución de tal manera que esté en un estado adecuado para su mezcla con el ácido carboxílico en la etapa (b). Esta etapa puede comprender mezclar la fracción plasmática con un tampón adecuado. Preferentemente, el tampón es de molaridad baja (es decir, menos de 1 M) y tiene un pH entre 4,5 y 5,5 por ejemplo, tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 5,0560±1. Se puede completar la mezcla utilizando un mezclador de palas o un agitador vibrador.

En la etapa (b), la solución formada en la etapa (a) se mezcla utilizando un agitador vibrador con un ácido carboxílico C<sub>7</sub> a C<sub>9</sub> para precipitar las proteínas contaminantes (por ejemplo, proteasas, virus, etc). El ácido carboxílico puede estar ramificado y/o puede incluir sustituyentes que no alteran sustancialmente el efecto de la etapa (b). El ácido carboxílico es preferentemente ácido octanoico. El ácido se añade preferentemente a una concentración de al menos 0,075 kg/kg de fracción plasmática, hasta una concentración de 0,2 kg/kg. Más preferentemente, el ácido se añade a 0,8 a 0,15 kg/kg de fracción plasmática, y lo más preferible entre 0,09 kg/kg y 0,13 kg/kg. Se puede usar ácido de cualquier molaridad conveniente para proporcionar la concentración correcta.

Se puede usar cualquier tipo de agitador vibrador comercialmente disponible, adecuado para el uso en la industria química/farmacéutica. Los ejemplos de agitadores vibradores adecuados están disponibles de Graber + Pfenninger GmbH. En particular, se puede usar el vibromezclador "Labormodell Typ 1" para los experimentos a escala laboratorio, y se puede usar el "Industriemixer Typ 4" para preparaciones a escala producción. Los mezcladores vibradores se pueden usar de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y en especial, en escenarios que los fabricantes describen como adecuados para la mezcla de soluciones que contienen proteínas. Por ejemplo, los mezcladores vibradores pueden funcionar usualmente a menos de 100 Hz con una amplitud de menos de 10 mm, por ejemplo, los presentes inventores llevaron a cabo la mezcla por vibración mediante el "Labormodell Typ 1" a escala laboratorio a 50 Hz, donde se usó un suministro eléctrico a 230 V. Se varió la amplitud de la vibración del proceso de mezcla entre 0 y 3 mm, y se usó preferentemente para la preparación de IgM la de 3 mm. En los experimentos a escala laboratorio se usaron agitadores de placas con un diámetro entre 23 mm y 65 mm. Para la producción a escala se usó un agitador de placas con un diámetro de 395 mm (diámetros de los huecos de 13,5 mm y 16 mm).

En la etapa (b), el pH de la solución mezclada está preferentemente entre 4,5 y 5,5, y más preferentemente entre pH 4,8 y pH 5,3. La etapa se puede llevar a cabo en tampón acetato de sodio, y, por ejemplo, con tampón acetato de sodio aproximadamente 0,1 M. La temperatura a la que se realiza la etapa (b) está preferentemente entre 10 °C y 35 °C, y más preferentemente 14 a 30 °C.

El tiempo de mezcla utilizando el agitador vibrador no está particularmente limitado, pero es preferentemente de al menos de 30 minutos y no superior a 3 horas, y más preferentemente de 40 - 110 minutos. Tiempos de incubación de menos de 30 minutos pueden reducir el nivel de inactivación del virus.

En una realización de la etapa (b) se mezcla fosfato tricálcico con la solución de la etapa (b). Preferentemente, se añade a 0,01 a 0,02 kg/kg de fracción de plasma (que está en forma sólida o semisólida). El fosfato de calcio se puede añadir simultáneamente, por separado o secuencialmente al ácido carboxílico. En una realización preferida, el fosfato tricálcico se añade al menos 20 minutos después del ácido carboxílico.

En la etapa (c), las proteínas contaminantes precipitadas en la etapa (b) se separan de la solución para dar como resultado la composición de inmunoglobulina que contiene IgM (es decir, una solución que contiene inmunoglobulina). Esta etapa de separación no está particularmente limitada pero se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado conocido en la materia. Sin embargo, la etapa de separación se lleva a cabo preferentemente utilizando filtración, y más preferentemente ultrafiltración, y el resultado de la etapa (c) es por tanto una solución filtrada.

Tal como se ha descrito anteriormente, el método de la presente invención es ventajoso en términos de fabricación debido a que parece producir una precipitación más eficaz de las proteínas contaminantes, y, como resultado, la etapa (c) es más fácil de realizar. Cuando la mezcla resultante de la etapa (b) se separa, una solución clara transparente, es decir, se consigue la composición de inmunoglobulina que contiene IgM. La filtración es por tanto más rápida y más fácil.

Se requieren etapas de proceso adicionales para convertir la composición de inmunoglobulina que contiene IgM obtenida de la etapa (c) en una preparación de inmunoglobulina adecuada para la administración intravenosa. De acuerdo con ello, en una realización preferida, el proceso de la presente invención comprende las etapas adicionales de tratar la composición de inmunoglobulina que contiene la IgM obtenida de la etapa (c) en condiciones ácidas suaves y, además, someter la composición tratada con ácido a radiación UVC.

Para el tratamiento en condiciones levemente ácidas, la composición de inmunoglobulina que contiene la IgM obtenida de la etapa (c) se incuba a entre pH 3,5 a pH 4,5, y preferentemente entre pH 3,8 y pH 4,2, para formar una solución incubada. Se pueden crear condiciones levemente ácidas añadiendo un ácido adecuado a la composición de inmunoglobulina que contiene IgM, por ejemplo, el pH se puede ajustar añadiendo HCl 0,2 M.

Esta etapa de incubación se lleva a cabo preferentemente a entre 32 y 42 °C, y más preferentemente a entre 35 y 39 °C. El tiempo de incubación es preferentemente al menos de 2 horas y no mayor de 24 horas, y más preferentemente al menos de 9 horas pero no mayor de 16 horas.

- 5 En la etapa de irradiación, la solución incubada obtenida procedente del tratamiento levemente ácido descrito anteriormente se traza con luz UVC para formar una solución irradiada con UVC. Esta etapa se puede llevar a cabo usando dispositivos que están comercialmente disponibles, tales como el dispositivo UVivatec® (Bayer Technology Services). Se prefiere que la solución incubada se trate a  $254 \pm 10$  nm con entre 200 y 500 J/m<sup>2</sup>, más particularmente entre 200 y 300 J/m<sup>2</sup>, para inactivar adicionalmente los virus y proteasas que están potencialmente presentes. Se indica que el tratamiento con UVC, en las condiciones suaves de tratamiento que se requerirían normalmente, solo son posibles con el filtrado en agua transparente que se obtiene en la presente invención tras el tratamiento con ácido octanoico y vibromezclado. Las soluciones más opalescentes u opacas normalmente obtenidas con las técnicas de agitación convencionales necesitarían tiempos de irradiación más largos que conducirían a mayor desnaturalización de la actividad de la IgM y menores tasas de inactivación del virus.
- 10 15 Además del tratamiento ácido suave y la irradiación con UVC, las etapas adicionales para conseguir una preparación de inmunoglobulinas para administración intravenosa puede opcionalmente comprender una o más etapas de filtración. En una realización, la solución de proteínas que se procesa puede adsorberse en DEAE-Sephadex y a continuación separarse de la Sephadex mediante filtración en profundidad. Por ejemplo, puede someterse adicionalmente a adsorción discontinua con 75 mg por kg de proteína de DEAE Sephadex a pH 5,8, para eliminar la proteína ceruloplasmina acompañante no deseada.
- 20 25 En una realización particularmente preferida, la solución incubada obtenida procedente del tratamiento ácido suave se somete a adsorción sobre DEAE-Sephadex y a continuación se separa de Sephadex mediante filtración en profundidad, antes de tratarse con irradiación UVC.
- 30 35 En otra realización, la solución de inmunoglobulina que se procesa puede filtrarse a través de un filtro nanométrico. Se pueden usar filtros de  $75 \pm 5$  nm a  $35 \pm 5$  nm de tamaño de poro, o filtros que tienen un tamaño de poro nominal de 75 a 35 nm (por ejemplo, Pall Ultipor DV50), en diversas etapas durante el proceso. (Un tamaño de poro nominal de por ejemplo, 50 nm corresponde a una tasa de retención  $\geq 4 \log_{10}$  para un virus con un tamaño de 50 nm o más). En una realización preferida, la solución obtenida de la etapa DEAE-Sephadex descrita en el anterior párrafo se filtra a través de un filtro de 0,2 µm antes de la irradiación con UVC. En una realización preferida adicional, la solución de inmunoglobulina obtenida tras la irradiación UVC se somete a nanofiltración, preferentemente mediante un filtro que tiene un tamaño de poros de 40 a 50 nm. Se prefiere que esta etapa se lleve a cabo en condiciones estériles.
- 40 45 La preparación final de anticuerpos (es decir, la solución de inmunoglobulina que contiene la IgM procesada) obtenida a partir del proceso definido anteriormente puede introducirse en un recipiente en condiciones estériles. Como alternativa, la preparación de anticuerpos puede formularse con un agente estabilizante, tal como glicina. En particular, la preparación puede formularse en un tampón que contiene glicina a un pH entre 4 y 5,5, y preferentemente entre 4,1 a 4,5. La preparación de anticuerpos puede también diluirse a una concentración de proteínas entre 40 y 80 g/l y preferentemente entre 55 y 70 g/l.
- 50 55 Preferentemente, el proceso de la presente invención no comprende una etapa que implica una o más modificaciones químicas de los anticuerpos de la preparación, la modificación enzimática de los anticuerpos, o el tratamiento térmico de los anticuerpos (por ejemplo, el tratamiento de los anticuerpos a una temperatura de 40 °C o más durante 10 minutos o más). Más particularmente, el proceso de la presente invención no incluye una etapa de poner en contacto los anticuerpos con β-propiolactona y/o pepsina.
- 60 65 La presente invención proporciona además una preparación de inmunoglobulina o una preparación de anticuerpos que se puede obtener mediante el proceso descrito anteriormente. La preparación de inmunoglobulina es policlonal y puede comprender al menos un 5 % de IgM, preferentemente, al menos un 15 % de IgM y más preferentemente al menos un 20 % de IgM. Las otras inmunoglobulinas son IgG e IgA. Preferentemente, la preparación de inmunoglobulina comprende entre 5 y 30 % de IgM (más preferentemente entre aproximadamente 15 y 30 %), entre 5 y 30 % de IgA (lo más preferible entre 15 y 30 %) y entre 40 y 70 % de IgG (lo más preferible entre 45 y 70 %). En el producto más preferido, el contenido de IgG es aproximadamente de 50 % y el contenido de IgM e IgA es cada uno de aproximadamente 25 %. Los valores promedio del porcentaje de, por ejemplo, IgM, proceden de la suma de IgG+IgA+IgM. Sin embargo, es también posible enriquecer el contenido en IgM adicional mediante métodos bien conocidos similares, por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico. Los valores se pueden determinar mediante nefelometría o mediante inmunoprecipitación de acuerdo con la Ph. Eur. (edición actual (2010) 2.9.17).
- En particular, las inmunoglobulinas de la preparación de inmunoglobulina no están químicamente modificadas. La preparación de inmunoglobulina no se ha tratado durante su proceso de producción con un agente químico tal como β-propiolactona para esterilizar el producto. De forma similar, la preparación no se ha tratado con proteasa añadida, tal como pepsina, para esterilizar el producto. De este modo, las inmunoglobulinas están sustancialmente en forma natural.

La preparación de anticuerpos tiene una actividad proteolítica menor que las preparaciones de anticuerpos descritas en la técnica anterior. En particular, la actividad proteolítica no es detectable en la preparación cuando se almacena a entre 2 a 8 °C. Se puede medir la actividad proteolítica mediante métodos de ensayo normalizados conocidos en la materia, tales como los que usan el sustrato cromógeno que se describe a continuación en el ejemplo 6. En dichos métodos se evaluó la actividad proteolítica mezclando un sustrato cromógeno (en particular uno sensible a al menos una serina proteasa) y una muestra de la preparación de anticuerpos (habitualmente diluida en tampón para satisfacer el intervalo lineal del ensayo) a 37 °C y controlar la cinética de absorción usando un espectrofotómetro. La actividad proteolítica de la muestra se calcula a partir de la diferencia de absorción inicial ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) utilizando la ecuación  $C (\text{U/l}) = S \times \Delta\text{Abs}/\text{min} \times F$  ( $C$  = actividad proteolítica;  $S$  = factor de conversión relativo a un cambio de adsorción específico del sustrato cromogénico; y  $F$  = factor de dilución). Uso del sustrato de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En particular, la actividad proteolítica se puede evaluar mediante las siguientes etapas:

- 15     (a) 25 mg del sustrato S-2288 (Chromogenix) se disolvieron en 7,2 ml de agua para inyección;
- (b) una muestra de la preparación de anticuerpo se diluyó con tampón (Tris.HCl 100 mM pH 8,4, NaCl 106 mM ) para satisfacer el intervalo lineal del ensayo, y la temperatura se ajustó a 37 °C;
- (c) cantidades iguales (por ejemplo, 200  $\mu\text{l}$ ) de la preparación de anticuerpo diluida y el sustrato disuelto se mezclaron;
- 20     (d) se midió la cinética de absorción a 405 nm durante de 1 a 3 minutos a 37 °C usando un espectrofotómetro;
- (e) la actividad proteolítica de la muestra se calcula a partir de la diferencia de absorción inicial ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) utilizando la ecuación  $C (\text{U/l}) = 313 \times \Delta\text{Abs}/\text{min} \times F$  ( $C$  = actividad proteolítica,  $F$  = factor de dilución)

El límite de cuantificación de este método es 8 U/l, y cuando se usa una muestra de la preparación de anticuerpo de la presente invención, la actividad proteolítica es indetectable. De esta forma, el nivel de actividad proteolítica en el producto final de la presente invención es inferior a 8 U/l.

Como con las preparaciones conocidas en la materia, la preparación de anticuerpos de la presente invención se puede almacenar a 5±3 °C. Sin embargo, debido a la eficaz purificación del método de la presente invención, la estabilidad de la preparación de anticuerpos es extremadamente buena. El producto final es estable en forma líquida durante al menos 3 meses, preferentemente al menos 6 meses y más preferentemente al menos dos años a 2 a 8 °C, lo que significa que no existe fragmentación o polimerización de IgM por encima del 5 % medida en HPSEC, ni aumento de la actividad proteolítica, ni disminución de la actividad del anticuerpo IgM contra Escherichia coli y de la actividad del anticuerpo IgM contra Pneumococcus saccharide de más del 25 % y no existe aumento en la actividad anticomplementaria de más del 25 %, quedando por debajo de 1 CH50/mg de proteína. Además, el producto final producido con el método de la presente invención es estable en forma líquida durante al menos 3 meses, preferentemente al menos 6 meses, y lo más preferente al menos un año a temperatura ambiente (entre 23 y 27 °C) como se ha evaluado mediante los mismos criterios.

40    El proceso de la presente invención proporciona además un nivel mayor de eliminación de virus que los procesos de la técnica anterior dando como resultado una preparación de anticuerpos que es más segura que las preparaciones de anticuerpos de la técnica anterior, particularmente con respecto a los virus sin envoltura activos del tipo, por ejemplo, parvovirus. El método de la presente invención es capaz de eliminar/inactivar virus, y en particular virus sin envoltura, en más de 3  $\log_{10}$ , preferentemente en más de 4  $\log_{10}$ , y lo más preferente en más de 5  $\log_{10}$ . Esto da como resultado una preparación de anticuerpos que está sustancialmente exenta de virus, y en particular sustancialmente exenta de virus sin envoltura (es decir, es segura contra virus). Además, el método de la presente invención puede conseguir este nivel de eliminación/inactivación de partículas víricas sin un impacto significativo sobre la cantidad de IgM activa o sobre la actividad anticomplementaria de la preparación de anticuerpos. De acuerdo con ello, las preparaciones de anticuerpos son seguras contra virus con respecto a los virus con envoltura y sin envoltura, que contienen al menos un 15 %, más preferentemente al menos un nivel del 20 % de IgM y que tienen actividad anticomplementaria de 1 CH 50/mg de proteína.

55    La preparación de anticuerpos de la presente invención es adecuada para su uso en medicina y se puede utilizar en el tratamiento de trastornos e infecciones inmunológicas, especialmente en trastornos por deficiencia de IgM y en infecciones bacterianas. La preparación de inmunoglobulina polivalente humana enriquecida con IgM humana para administración intravenosa, que se puede preparar mediante el proceso de la presente invención, contiene títulos de anticuerpo más altos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas clínicamente relevantes así como títulos de anticuerpo más altos contra endotoxinas de bacterias Gram negativas y exotoxinas de bacterias Gram positivas en comparación con las preparaciones polivalentes de inmunoglobulina G.

60    En particular, las preparaciones de anticuerpo de la presente invención son adecuadas para su administración por vía intravenosa a pacientes, y en particular son adecuadas para la inyección intravenosa en seres humanos.

65    De esta manera, la preparación de anticuerpos de la presente invención es adecuada para su uso en un método de tratamiento de un paciente que comprende una etapa de administrar la preparación de anticuerpos de la presente invención al paciente. En particular, el paciente puede padecer un trastorno inmune o una infección bacteriana.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente por medio de ejemplos solamente.

**Descripción del método de ensayo para la determinación de la actividad anticomplementaria**

5 El ensayo para determinar la actividad anticomplementaria se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en la Farmacopea Europea (método 2.6.17, Ph. Eur. 6. Edición, 2008).

10 Eritrocitos de oveja pretratados con hemolisina se hemolizaron completamente. La hemólisis se suprimió mediante anticuerpos que se unían al complemento de la muestra. Se determinó la cantidad de complemento, que está unido (inactivado) a 1 mg de inmunoglobulina.

15 Una determinada cantidad de inmunoglobulina (10 mg) se mezcló con el complemento de cobayas, y se tituló el complemento libre. La actividad anticomplementaria se expresa como complemento usado con respecto al complemento usado de una solución de referencia. La unidad hemolítica de la actividad del complemento ( $CH_{50}$ ) es la cantidad de complemento que conduce a la hemólisis de  $2,5 \times 10^8$  eritrocitos preparados de forma óptima de una cantidad total de  $5 \times 10^8$  eritrocitos en condiciones óptimas de tampón.

20 Los eritrocitos preparados de forma óptima (8 ml de eritrocitos estabilizados de oveja, lavados tres veces con tampón de gelatina-barbital, finalmente, 1 ml de eritrocitos se suspendieron en 24 ml de tampón de gelatina-barbital) se prepararon mezclando 20 ml de suspensión de eritrocitos con 20 ml de hemolisina (ajustado a 2 MHE/ml -mínima unidad hemolítica) e incubación durante 15 min a 37 °C.

25 Un equivalente de 10 mg de inmunoglobulina se diluyó en tampón de gelatina-barbital (1 g de gelatina en 1 l de tampón de barbital, pH 7,3, solución tampón de barbital 5 veces: 83 g de cloruro de sodio, 10,192 g de barbital sodio en 2 litros de agua, pH 7,3). Hasta un volumen final de 1 ml, se añadieron 200 µl de complemento 100  $CH_{50}$ /ml. Los tubos de ensayo se incubaron con agitación durante 1 h a 37 °C. Las muestras se diluyeron y se titularon frente a eritrocitos preparados de forma óptima. Tras una incubación durante 1 h a 37 °C, las muestras se centrifugaron y se determinó la densidad óptica utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 541 nm.

30 **Ejemplo 1 -Preparación de una preparación enriquecida en IgM a partir de la fracción I/III**

35 180 kg de Fracción I/III de Cohn, originada a partir del fraccionamiento en etanol frío de plasma humano se suspendieron en 720 l de tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 5,05 y se mezclaron durante 15 - 30 minutos una vez que se alcanzó la temperatura de la suspensión ( $22 \pm 4$  °C).

40 35 La solución se trató mediante la adición de 19,8 kg de ácido octanoico (0,110 kg por kg de pasta I/III utilizada) a temperatura ambiente, y la solución de proteína se mezcló adicionalmente durante 80 minutos, usando un mezclador por vibración (Vibromixer®, tamaño 4, Gruber+Pfenniger GmbH, Vibromixer ajustado al nivel 2 - 3). El ácido octanoico se añadió lentamente durante 30 min.

45 40 Aproximadamente 3 kg de fosfato tricálcico ( $Ca_3(PO_4)_2$ ) se añadieron a lo anterior, y la solución de proteína se mezcló adicionalmente durante al menos 15 min. El precipitado se eliminó mediante filtración con clarificación usando un filtro prensa. Se llevó a cabo una filtración 0,2 µm, y la solución de proteínas se sometió a ultrafiltración con membranas de 10 kD. La solución de proteínas se diafiltró contra una solución de NaCl 0,04 M y después se ajustó a una concentración de proteínas de 40 g/l.

50 50 La solución de proteína se trató a un pH  $4,0 \pm 0,1$  tras dilución 1+1 con agua para inyección. El ajuste del pH se realizó usando HCl 1 M y la solución de proteína se incubó durante 9 h a  $37^\circ C \pm 2$  °C. Tras la incubación a pH 4, la solución de proteína se ajustó a pH 5,8, usando NaOH 1 M. La solución de proteína resultante se purificó adicionalmente mediante adición de DEAE Sephadex en modo discontinuo (75 g DEAE Sephadex por kg de proteína). La solución de proteínas se incubó con agitación durante  $\geq 60$  min a temperatura ambiente. La DEAE Sephadex se eliminó mediante filtración con clarificación. La solución de proteína se sometió a una filtración 0,2 µm.

55 60 La solución de proteína se filtró a través de un filtro de 0,1 µm y un filtro Pall, Ultipor VF DV50, 20". El filtrado se procesó adicionalmente mediante tratamiento con luz UVC a 254 nm, utilizando un dispositivo de proceso de flujo pistón UVivatec® (Bayer Technology Services / Sartorius Stedim) a una dosis de UVC de 240 J/m<sup>2</sup>. La velocidad de flujo a través del reactor UVC se calculó según las instrucciones del fabricante. La solución de proteína irradiada se concentró hasta una concentración de proteína de 50 - 70 g/l mediante ultrafiltración, y se sometió a diafiltración (membrana de 10 kD, usando tampón de glicina 0,32 M pH 4,3). El producto final se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenó de 2 a 8 °C.

**Ejemplo 2 - Investigación de las condiciones en la etapa de tratamiento con ácido octanoico**

65 Para el tratamiento con ácido octanoico, se sometieron a ensayo los siguientes intervalos experimentales, también combinados entre sí usando el método descrito en el Ejemplo 1 (no se muestran los resultados).

- Cantidad de ácido octanoico: 0,09 kg/kg a 0,13 kg/kg (Cantidad de ácido octanoico por kg usado de fracción I/III) (ácido octanoico 120 a 180 mM)
- pH del tratamiento con ácido octanoico entre pH 4,8 y 5,3
- Intervalo de temperatura de la reacción: 14 °C a 30 °C
- Tiempo de incubación: 40 a 110 min

5 Todas las condiciones ensayadas condujeron a compuestos intermedios fáciles de clarificar para su procesamiento posterior, y con una amplia reducción de la actividad proteolítica desde varios miles de U/l en la fracción de Cohn suspendida I/III). Estos compuestos intermedios dan como resultado un producto final con una actividad proteolítica inferior a 8 U/l (calculada como se describe más adelante en el Ejemplo 6), que es el límite de cuantificación.

**Ejemplo 3 - Reducción de virus mediante el uso de Vibromixer -Determinación de los factores de eliminación de virus para el tratamiento con ácido octanoico con y sin el uso de un vibromixer.**

15 250 ml de fracción I/III suspendida se homogeneizaron durante 30 min a pH 5,05 y 22 . La suspensión se enriqueció con 2,6 ml de la solución madre de virus. Se añadió ácido octanoico (110 g/kg) y se homogeneizó durante 60 min con un vibromixer. En un experimento paralelo, la misma mezcla se homogeneizó mediante agitación convencional. Después de 60 min se añadió fosfato tricálico (0,15 g/kg de ácido octanoico) y la suspensión se agitó durante 15 min. La suspensión se aclaró mediante filtración profunda usando un disco de filtro. El filtro de disco se preaclaró con 20 70 - 80 ml de tampón. Tras la filtración, el filtro de disco se enjuagó con 80 ml de tampón. El filtrado y el lavado se combinaron, y se extrajo una muestra para la titulación del virus.

25 Los títulos de virus de las muestras tomadas antes de la adición de ácido octanoico y después de la filtración se determinaron con células indicadoras adecuadas para SV40, Reo y PPV (CV-1, CCL.7.1 y PK13). Finalmente, se calculó el factor de eliminación según las directrices actuales de los estudios de validación de virus.

30 En los estudios de validación de virus, los virus sin envoltura como SV40 y Reo se eliminaron eficazmente en el orden de más de 4 log<sub>10</sub> y más de 5 log<sub>10</sub>, respectivamente. Además, el PPV se eliminó en más de 3 log<sub>10</sub>. Estos valores son más de 10 veces y hasta 1000 veces superiores que con el mismo tratamiento con ácido octanoico en condiciones de agitación convencionales sin el vibromezclador.

**Tabla 1: Comparación entre los factores de reducción del virus (log<sub>10</sub>) para el tratamiento con ácido octanoico con y sin el uso de un vibromezclador.**

	Reacción con ácido octanoico y agitación convencional [reducción de log <sub>10</sub> ]	Reacción con ácido octanoico y vibromezclado [reducción de log <sub>10</sub> ]
VPP	2,15 ± 0,32	3,39 ± 0,36
REO	2,34 ± 0,38	5,46 ± 0,28
SV40	2,05 ± 0,4	4,71 ± 0,34

35 **Ejemplo 4 - Evaluación del tratamiento con UVC tratamiento**

40 Se evaluó el intervalo óptimo de la dosificación de radiación UVC. Existe un equilibrio entre la dosificación mínima necesaria para conseguir una inactivación de al menos 4 log<sub>10</sub> para virus sin envoltura y la dosificación máxima tolerable para evitar la desnaturalización de las moléculas de IgM que conduce a una función Fab incorrecta para unir los antígenos y una función Fc incorrecta que afecta la activación del complemento. En el intervalo de 200 a 400 J/m<sup>2</sup> se puede observar solamente un leve aumento de los agregados de inmunoglobulina y no se observa afectación significativa sobre el contenido del fragmento.

45 Para los experimentos, la densidad óptica (DO) de la solución de proteína original se utilizó para calcular el caudal en el sistema de laboratorio UVivatec con la hoja de cálculo Excel proporcionada por el proveedor de BTS (Hoja de cálculo maestra del cliente UVivatec Lab II Versión 3.0). El caudal se calculó teniendo en cuenta el rendimiento de la lámpara, el punto de ajuste del sensor de la lámpara de la señal UV y la dosis de irradiación UVC deseada.

50 Una solución que contenía IgM con un contenido de proteína de aproximadamente 55 g/l (Lote 86GB005BE07) se bombeó a un caudal del 5,8 l/h a través del sistema UVivatec para conseguir una dosis de 200 J/m<sup>2</sup> para un único flujo pistón. Se consiguió una dosis de 300 J/m<sup>2</sup> bombeando la solución de proteína a un caudal de 3,9 l/m<sup>2</sup> a través del sistema. Se consiguieron 400 J/m<sup>2</sup> bombeando la solución de proteína a un caudal de 2,9 l/m<sup>2</sup> a través del sistema.

**Tabla 2: Resultados analíticos de la actividad y determinaciones de títulos antes y después del tratamiento con UVC en el producto final concentrado**

		Producto IgM sin irradiación UVC	Producto después de UVC 200 J/m <sup>2</sup>	Producto después de UVC 300 J/m <sup>2</sup>	Producto después de UVC 400 J/m <sup>2</sup>
Contenido de proteína	g/l	56,3	56,2	57,6	54,4
Contenido de IgG (nefelometría)	%	56,1	55,5	55,7	54,9
Contenido de IgA (nefelometría)	%	20,1	20,6	20,5	20,7
Contenido de IgM (nefelometría)	%	23,7	23,9	23,7	24,4
HPSEC agregados > 1200 kD fragmentos (> 100 kD)	% área	1,9	2,6	3,3	4,0
	% área	0,66	0,73	0,76	0,79
ACA	CH50/mg proteína	0,68	0,48	0,46	0,46
PA	U/l	< 8	< 8	< 8	< 8

5 No se pudieron observar diferencias significativas para el contenido de inmunoglobulina, actividad proteolítica o ACA en el intervalo de 200 a 400 J/m<sup>2</sup>. El intervalo preferido para la dosificación se ajustó entre 200 y 300 J/m<sup>2</sup> porque 200 J/m<sup>2</sup> era suficiente para inactivar los virus sin envolturas y a 300 J/m<sup>2</sup> no se pudo observar impacto significativo sobre la formación de agregados y los títulos de anticuerpo. La dosificación preferida es 225 J/m<sup>2</sup>

10 Una solución diluida que contenía IgM con un contenido de proteína de 8 a 12 g/l (Lote 86BB059BE07) se bombeó a un caudal de 5,8 l/h a través del sistema UVivatec para conseguir dosis entre 200 y 300 J/m<sup>2</sup> para un único flujo pistón.

**Tabla 3: Resultados analíticos de las soluciones de IgM antes y después de la irradiación con UVC a diferentes dosis de UVC**

Lote fracción I/III 86BB059BE07		antes UVC	UVC: 200 J/m <sup>2</sup>	UVC: 225 J/m <sup>2</sup>	UVC: 250 J/m <sup>2</sup>	UVC: 300 J/m <sup>2</sup>
Proteína	g/l	11,34	10,56	10,65	10,69	10,56
Contenido en IgG	%	59,2	59,1	58,5	58,6	57,1
Contenido en IgA	%	19,6	19,6	20,2	20,1	20,3
Contenido en IgM	%	21,1	21,3	21,2	21,4	22,6
HSEC agregados > 1200 kD % fragmentos < 100 kD	%	0,20	0,39	0,54	0,3	0,47
	%	0,47	0,46	0,25	0,26	0,47
PA	U/l	< 8	< 8	n.t.	n.t.	n.t.
PKA	U/ml	3	3	3	3	3
ACA	CH50/mg proteína	0,1	0,08	0,1	0,1	0,18
Anti-E.coli O1:K1 - IgG	U/mg	24,7	20,5	18,9	19,5	20,2
Anti-E.coli O1:K1 - IgA	U/mg	9,4	9,5	9,5	9,1	8,9
Anti-E.coli O1:K1 - IgM	U/mg	14,1	13,0	15,1	13,9	13,4
Anti-Candida albicans - IgG	U/mg	15,6	16,8	17,9	17,3	17,0
Anti-Candida albicans - IgA	U/mg	11,3	11,6	10,5	10,3	10,4
Anti-Candida albicans - IgM	U/mg	13,8	13,3	13,7	13,9	13,1
Anti-Enterococcus faecalis - IgG	U/mg	13,0	15,5	13,5	14,8	15,0
Anti-Enterococcus faecalis - IgA	U/mg	11,3	10,5	10,1	9,7	9,6
Anti-Enterococcus faecalis - IgM	U/mg	17,2	14,1	16,7	14,0	13,9
Anti-Pneumococcus Saccharid - IgG	U/mg	23,2	24,1	24,7	24,0	25,7
Anti-Pneumococcus Saccharid - IgA	U/mg	13,3	12,1	18,0	16,5	14,8
Anti-Pneumococcus Saccharid - IgM	U/mg	17,5	15,1	18,0	16,4	16,6

La distribución entre las clases de inmunoglobulina sigue quedando inalterada mediante el procedimiento de irradiación con UV comprendido en este intervalo de dosificación. El modelo de distribución de pesos moleculares analizado mediante HPSEC tampoco cambia. El nivel de pureza analizado mediante CZE permanece inalterado. La actividad proteolítica (PA), el activador precalicreína (PKA) y la actividad anti-complementaria (ACA) permanece inalterada. Igualmente, la actividad antibacteriana medida por un método Elisa no se ve significativamente alterada para todas las clases de inmunoglobulinas.

Las alícuotas -irradiadas con intensidades crecientes de UV- se procesaron adicionalmente hasta conseguir el producto final, y se sometió al mismo panel de ensayos analíticos. Tampoco hubo diferencia significativa observable en los productos finales. Todos los títulos de anticuerpo sometidos a ensayo estuvieron siempre en el intervalo de  $100 \pm 10\%$  de la preparación de control no tratada mediante UVC.

**Ejemplo 5 - Reducción global de virus mediante el uso de Vibromixer/tratamiento pH 4 y tratamiento con UVC -Determinación de los factores de eliminación de virus**

La validación de la eliminación/inactivación de virus en tras tres etapas de tratamiento con ácido octanoico y vibromezclado, tratamiento a pH 4 y tratamiento con UVC ( $215 \text{ J/m}^2$ ) se llevó a cabo usando los siguientes virus modelo: virus de la diarrea vírica de bovino (DVBV) como virus modelo del virus de la hepatitis C, el virus de la pseudorrabia (VSR) como virus modelo del virus del herpes humano, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1), virus de la arteritis equina (VAE) como virus modelo de los coronavirus, virus sindbis (VSin) como virus modelo de los Flavivirus, virus de la encefalomielitis de murino (VEM) como virus modelo del virus de la hepatitis A, reovirus (Reo) como virus modelo de los virus sin envoltura, parvovirus porcino (PVP) como virus modelo del parvovirus humano B 19.

Los resultados de estos estudios con las tres etapas de tratamiento con ácido octanoico, tratamiento a pH 4 y tratamiento con UVC se relacionan en la siguiente Tabla 2.

**Tabla 4: Reducción total de virus mediante el proceso de producción de IgM**

Virus modelo	DVBV	VSR	VIH-1	VAE	SinV	VEM	Reo	VPP
Reducción total ( $\log_{10}$ )	> 12,5	> 10,1	> 12,7	> 8,4 <sup>a</sup>	> 13,7 <sup>a</sup>	9,2	> 11,0	> 8,4

<sup>a</sup> Factor de reducción sin datos de validación para la etapa de validación con UVC

La nanofiltración opcional con filtros de un tamaño nominal de poro de aproximadamente 50 nm añade seguridad adicional aumentando la reducción total en más de 17 log<sub>10</sub> dependiendo del tamaño del virus. Por ejemplo >17.5 log<sub>10</sub> se alcanzan a continuación para VIH-1 mientras que PPV no se eliminó adicionalmente mediante nanofiltración.

Por tanto, el procedimiento de purificación de acuerdo con la invención conduce a una preparación de IgM notablemente segura contra virus con unas tasas de inactivación/reducción de virus no conseguidas hasta ahora para dicha preparación que contiene IgM superiores a 8 log<sub>10</sub>. Esto es especialmente importante para los virus sin envoltura tales como VEM, Reo y PVP, que por lo general son más resistentes contra los procedimientos de inactivación y eliminación de virus debido a un pequeño tamaño y la carencia de una envoltura lípida.

**Ejemplo 6: Determinación de la actividad proteolítica residual para el tratamiento con ácido octanoico con y sin uso de un vibromixer.**

El tratamiento con ácido octanoico se llevó a cabo como en el ejemplo 1 y, en un experimento paralelo sin un vibromixer pero con agitación intensa convencional con un agitador de palas. Se determinó la actividad proteolítica en las muestras después del tratamiento con ácido octanoico/fosfato tricálcico y ultra/diafiltración usando el sustrato cromogénico S-2288 (Chromogenix), siguiendo las instrucciones del fabricante. 25 mg del sustrato S-2288 (Chromogenix) se disolvieron en 7,2 ml de agua para inyección. Las muestras se diluyeron con tampón (Tris/HCl 100 mM pH 8,4, NaCl 106 mM) para satisfacer el intervalo lineal del ensayo, por ejemplo, 200 µl de tampón se mezclaron con 200 µl de muestra (mezclado y ajuste de temperatura a 37 °C) y 200 µl de solución de sustrato cromogénico. Se midió la cinética de absorción a 405 nm (1-3 minutos) a 37°C, mediante un espectrofotómetro. La actividad proteolítica de la muestra se calcula a partir de la diferencia de absorción inicial ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) mediante la ecuación  $C (\text{U/l}) = 313 \times \Delta\text{Abs}/\text{min} \times F$  ( $C$  = actividad proteolítica,  $F$  = factor de dilución)

**Tabla 5: Reducción de la actividad proteolítica mediante el tratamiento con ácido octanoico**

	Tratamiento con ácido octanoico sin vibromezclado	Tratamiento con ácido octanoico con vibromezclado
<b>Materiales de partida (U/l)</b> <b>Actividad proteolítica residual promedio después del tratamiento con ácido octanoico/fosfato (U/l)</b>	5630 42	5630 < 8 (LOD)

Cuando se utilizó vibromezclado, el filtrado después del tratamiento con ácido octanoico fue límpido. En el experimento de comparación, el filtrado después del tratamiento con ácido octanoico y el agitador de palas era muy opaco y difícil de filtrar.

#### Ejemplo 7: Títulos antibacterianos en una preparación de IgM de acuerdo con la invención

Para su comparación con la única preparación que contiene IgM tolerable intravenosa comercialmente disponible, Pentaglobin, las actividades antibacterianas se analizaron en tres lotes de este fármaco bien caracterizado, y se compararon con una preparación de acuerdo con la invención. La determinación de los anticuerpos de la clase IgA o IgM en la preparación de IgM comparada con los antígenos antibacterianos o antifúngicos se llevó a cabo mediante ELISA. Placas de microvaloración se revistieron con el correspondiente antígeno y se incubaron con un patrón o la preparación de IgM. Los anticuerpos unidos al antígeno se detectaron con un conjugado de IgA dirigido contra IgG humana o un conjugado de IgM dirigido contra IgG humana. La detección se llevó a cabo usando un sustrato de enzima. El cambio de color resultante corresponde a la cantidad de anticuerpos presentes en la preparación de IgM.

**Tabla 6 Comparación de la actividad de unión antibacteriana de IgM en la presente preparación y en Pentaglobin comercialmente disponible**

parámetro	unidad	IgM presente en el medio de preparación	Promedio en el producto comercial Pentaglobin
Anticuerpos IgM contra <i>Pneumococcus saccharide</i>	U/mg IgM	72	21
Anticuerpos IgM contra <i>Escherichia coli</i>	IgM	62	39
Anticuerpos IgM contra <i>Enterococcus faecalis</i>	U/mg IgM	69	27
Anticuerpos IgM contra <i>Candida albicans</i>	U/mg IgM	61	41
Anticuerpos IgM contra <i>Chlamydia</i>	U/mg IgM	71	6

**Tabla 7 Comparación de la actividad de unión antibacteriana de IgA en la presente preparación y en Pentaglobin comercialmente disponible**

parámetro	unidad	IgM presente en el medio de preparación	Promedio en el producto comercial Pentaglobin
Anticuerpos IgA contra <i>Pneumococcus saccharide</i>	U/mg IgA	86	25
Anticuerpos IgA contra <i>Escherichia coli</i>	U/mg IgA	83	26
Anticuerpos IgA contra <i>Enterococcus faecalis</i>	U/mg IgA	93	21
Anticuerpos IgA contra <i>Chlamydia</i>	U/mg IgA	65	38
Anticuerpos IgA <i>Helicobacter pylori</i>	U/mg IgA	59	24

Las actividades mediadas por IgM e IgA en la nueva preparación fueron típicamente al menos 1,5 veces tan altas como en Pentaglobin, lo que se puede explicar por el hecho de IgM e IgA de Pentaglobin están modificadas químicamente con β-propiolactona. Esta etapa se sustituye por los procedimientos más suaves de acuerdo con la presente invención.

En su conjunto, estos datos demostraron que la región de unión de las moléculas IgM en la preparación final está funcionalmente completamente activa.

**Ejemplo 8 - Estudios de estabilidad durante el almacenamiento con el producto de IgM líquido**

El producto de acuerdo con el Ejemplo 1 sin tratamiento con UVC se almacenó en viales de vidrio de 10 o 100 ml (volumen de llenado 5 ml o 50 ml) a 2 - 8 °C y se analizaron todos los parámetros de la especificación. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Los parámetros relevantes para mostrar la estabilidad son el contenido en fragmentos y agregados que se mide mediante cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HPSEC), la actividad proteolítica (AP) y la actividad anti-complementaria (ACA). Estos parámetros son fundamentales para la tolerabilidad intravenosa, y es probable que cambien durante el almacenamiento a largo plazo. A 2 - 8 °C no se produjeron cambios significativos en estos parámetros. Incluso durante el almacenamiento a temperatura ambiente (23 - 27 °C), estos valores permanecieron dentro de la especificación, aunque se produjo un pequeño aumento de fragmentos después de 24 meses a temperatura ambiente. También se determinaron otros parámetros, como la coloración, opalescencia, valor del pH y permanecieron inalterados durante la totalidad del periodo de estudio. Los títulos de IgM e IgA frente a diferentes bacterias permanecieron estables durante 2 años a 2 - 8 °C.

El producto de acuerdo con el ejemplo 1 con tratamiento con UVC se almacenó en viales de vidrio de 10 o 100 ml (volumen de llenado 5 ml o 50 ml) a 2 - 8 °C y temperatura ambiente y se analizaron todos los parámetros de la especificación. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Es este estudio de estabilidad continuado, los datos a 12 meses actualmente disponibles muestran el mismo perfil de estabilidad que el producto sin tratamiento UVC, lo que permite extrapolar la estabilidad a 24 meses.

**Tabla 8 Estabilidad del lote A586067 ensayado a 2-8 °C en posición de reposo Tamaño de llenado: 5 ml**

Parámetros ensayados	Requisito (Tolerancia)	Almacenamiento en meses a 2 - 8 °C								23 – 27 °C
		0	3	6	9	12	18	24	24	
proteína (g/l)	45-55	50,3	51,4	50,3	50,4	50,5	49,6	50,8	49,8	
HPSEC % agregados > 1200 kD fragmentos < 100 kD	≤ 5 ≤ 5	0,9 0,2	0,6 0,6	0,5 1,1	0,8 0,7	0,6 1,6	1,0 0,9	1,3 1,2	1,7 4,1	
actividad proteolítica (U/l)	< 8	< 8	< 8	< 8	n.t.	< 8	n.t.	< 8	< 8	
contenido en inmunoglobulina (%)	> 95 %	96,7	99,0	100	n.t.	99,5	n.t.	98,4	97,5	
Contenido en IgM	≥ 20 %	21,6	22,1	22,1	n.t.	22,3	n.t.	20,9	20,5	
actividad anticomplementaria (CH50/mg proteína)	≤ 1,0	0,48	0,56	0,48	0,66	0,70	0,64	0,54	0,38	
n.t. = no ensayado										

**Tabla 9 Estabilidad del lote A586057 ensayado a 2-8 °C en posición de reposo Tamaño de llenado: 50 ml**

Parámetros ensayados	Requisito (Tolerancia)	Almacenamiento en meses a 2 - 8 °C								23 – 27 °C
		0	3	6	9	12	18	24	24	
proteína (g/l)	45-55	50,2	50,8	49,7	50,4	50,3	49,4	50,3	49,7	
HPSEC % agregados > 1200 kD fragmentos < 100 kD	≤ 5 ≤ 5	0,9 0,3	0,5 0,6	0,4 1,0	0,8 0,9	0,6 1,4	1,0 1,2	1,3 1,2	1,5 4,2	
actividad proteolítica (U/l)	< 8	< 8	< 8	< 8	n.t.	< 8	n.t.	< 8	< 8	
contenido en inmunoglobulina (%)	> 95 %	98,6	98,9	100	n.t.	99,5	n.t.	98,5	98,0	
Contenido en IgM	≥ 20 %	21,3	22,3	24,5	n.t.	22,0	n.t.	20,9	20,1	
actividad anticomplementaria (CH50/mg proteína)	≤ 1,0	0,48	0,82	0,52	0,64	0,68	0,48	0,60	0,40	

**Ejemplo 9 Experimentos in vivo en el producto IgM**

Para confirmar la seguridad y la tolerabilidad, se estudiaron los efectos de la preparación de IgM sobre la tensión arterial tras infusiones intravenosas repetidas durante 5 días a 8 macacos conscientes. Se administró una dosis de 190 mg/IgM/kg/día de la preparación de IgM preparada de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Pentaglobin, la preparación que contiene IgM tolerable para administración intravenosa comercialmente disponible se administró a algunos monos como sustancia de comparación. Pentaglobin se administró de manera que se administrara la misma dosis de IgM. Se administró una dosis de control de NaCl al 0,9 % a los animales un poco antes de la administración de las preparaciones de inmunoglobulina. La tensión arterial se determinó después

de la inyección para determinar si la administración estaba asociada con un nivel intolerable de activación del complemento no específica.

5 La administración de la preparación de IgM (15 ml/kg/día) solo tuvo efectos menores sobre la tensión arterial (promedio, sistólica y diastólica). Las diferencias hasta 4 horas después de cada infusión, en comparación con los valores anteriores al ensayo, no superaron los 4 mm Hg. Estas diferencias se pueden considerar como no biológicamente relevantes.

10 Los niveles de C3a se determinaron en muestras de plasma tomadas tras la inyección como marcador de la activación no específica de la ruta del complemento. Los niveles de C3a [ng/ml] solamente aumentaron ligeramente mediante la administración de la preparación de IgM (15 ml/kgPC) y fueron incluso inferiores a los obtenidos con la preparación de referencia Pentaglobin comercialmente disponible para cantidades iguales de IgM. La extracción de sangre se realizó aproximadamente 6 horas después del tratamiento.

15 **Tabla 10a Niveles de C3a [ng/ml] tras la administración de la preparación de IgM**

	C3a en el control (NaCl al 0,9 %, pH 4,5) [ng/ml]	Administración de C3a en la preparación de IgM [ng/ml]
Promedio	229	240
SD	83	37
N	8	8

20 No se pudieron atribuir hallazgos toxicológicos sustanciales a la preparación de IgM, y no se produjeron alteraciones relevantes que no se hubieran observado con Pentaglobin. Puesto que la seguridad de Pentaglobin está bien establecida en la práctica clínica durante muchos años, es razonable concluir que estas alteraciones no tienen ninguna relevancia clínica.

**Tabla 10b Niveles de C3a [ng/ml] tras la administración de la preparación de referencia Pentaglobin**

	C3a en el control (NaCl al 0,9 %, pH 6,8) [ng/ml]	Administración de C3a en la preparación de IgM [ng/ml]
Promedio	204	263
SD	20	61
N	4	4

25 La buena tolerabilidad y seguridad de la preparación de IgM también se verificó en un estudio en Fase I con seres humanos en 24 voluntarios sanos, hombres y mujeres. La presión arterial sistólica en las primeras 4 horas tras la administración produjo una disminución promedio de solo aproximadamente un 9 % (11,9 mmHg) tras la infusión de 91 a 274 mg de la preparación de IgM por kg PC/d a 0,5 ml/min.

30 Este intervalo es análogo a la solución de placebo de NaCl al 0,9 % (9,4 %, 11,7 mmHg). No se registraron eventos adversos graves, y todos los eventos adversos no graves quedaron autolimitados. Además, no se produjo evidencia de la transmisión de un agente infeccioso, tal como se muestra mediante las determinaciones de PCT.

35 Se anota que la utilidad de los estudios de eficacia en modelos animales de las enfermedades relevantes son limitados debido a la inmunogenia y a los anticuerpos Gal preformados en las preparaciones de IgM obtenidas de plasma humano. Sin embargo, dado el conocimiento de la técnica anterior con respecto al uso de Pentaglobin en el tratamiento de patologías y los títulos de anticuerpos antibacterianos de la preparación de IgM preparada mediante el método de la presente invención (como se ha demostrado en el Ejemplo 7) se puede concluir que la preparación de IgM tiene eficacia clínica.

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de una composición de inmunoglobulina que contiene IgM a partir de una fracción de plasma que comprende inmunoglobulinas, comprendiendo el proceso:

- (a) proporcionar una fracción plasmática en forma de solución que contiene las inmunoglobulinas;  
 (b) mezclar un ácido carboxílico C<sub>7</sub> a C<sub>9</sub> con la solución y tratar la solución mezclada con un agitador vibrador para precipitar las proteínas contaminantes; y  
 (c) separar las proteínas precipitadas a partir de la solución para dar como resultado la composición de inmunoglobulina que contiene la IgM.

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde en la etapa (b):

- (i) la concentración del ácido carboxílico C<sub>7</sub> a C<sub>9</sub> es al menos de 0,075 kg/kg de fracción plasmática; y/o  
 (ii) el pH de la solución mezclada está entre 4,5 y 5,5; y/o  
 (iii) la temperatura de la solución mezclada es de 10 °C a 35 °C; y/o  
 (iv) el ácido carboxílico C<sub>7</sub> a C<sub>9</sub> se incubó con la solución que contenía las inmunoglobulinas durante al menos 30 minutos.

3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 donde:

- (i) el ácido carboxílico C<sub>7</sub> a C<sub>9</sub> es ácido octanoico; y/o  
 (ii) las inmunoglobulinas de la fracción plasmática comprendan al menos un 5 % de IgM; y/o  
 (iii) la fracción plasmática es una precipitación de la fracción I/III de Cohn o la fracción B o B+I de Kistler/Nitschmann; y/o  
 (iv) la etapa (c) comprende ultrafiltración y la composición de inmunoglobulina comprende una solución filtrada.

4. Un proceso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que comprende una etapa de incubar la composición de inmunoglobulina que contiene la IgM procedente de la etapa (c) a entre pH 3,5 y pH 4,5 para formar una solución incubada, y preferentemente donde la etapa de incubar la composición de inmunoglobulina que contiene la IgM procedente de la etapa (c) se lleva a cabo a entre 32 y 42 °C.

5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además las etapas de someter la solución incubada a adsorción en DEAE-Sephadex y separar la DEAE Sephadex procedente de la solución mediante filtración en lecho.

6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende además la etapa de someter el filtrado procedente de la filtración en lecho a nanofiltración, y preferentemente donde la nanofiltración se lleva a cabo con un filtro de 35 a 75 nm de tamaño de poro nominal y más preferentemente de 40 a 50 nm de tamaño de poro nominal.

7. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 que comprende además una etapa de tratar la solución incubada de la reivindicación 4 o el filtrado de la reivindicación 5 o la reivindicación 6 con irradiación UVC para formar una solución irradiada con UVC, y preferentemente donde la solución incubada o el filtrado se trata con irradiación UVC de 200 a 500 J/m<sup>2</sup>, y más preferentemente de 200 a 300 J/m<sup>2</sup>.

8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende además la etapa de filtrar la solución irradiada con UVC en condiciones estériles para producir una preparación de anticuerpos adecuada para la administración intravenosa y que comprende preferentemente además formular la preparación de anticuerpos en un tampón que contiene glicina a un pH entre pH 4 y 5,5.

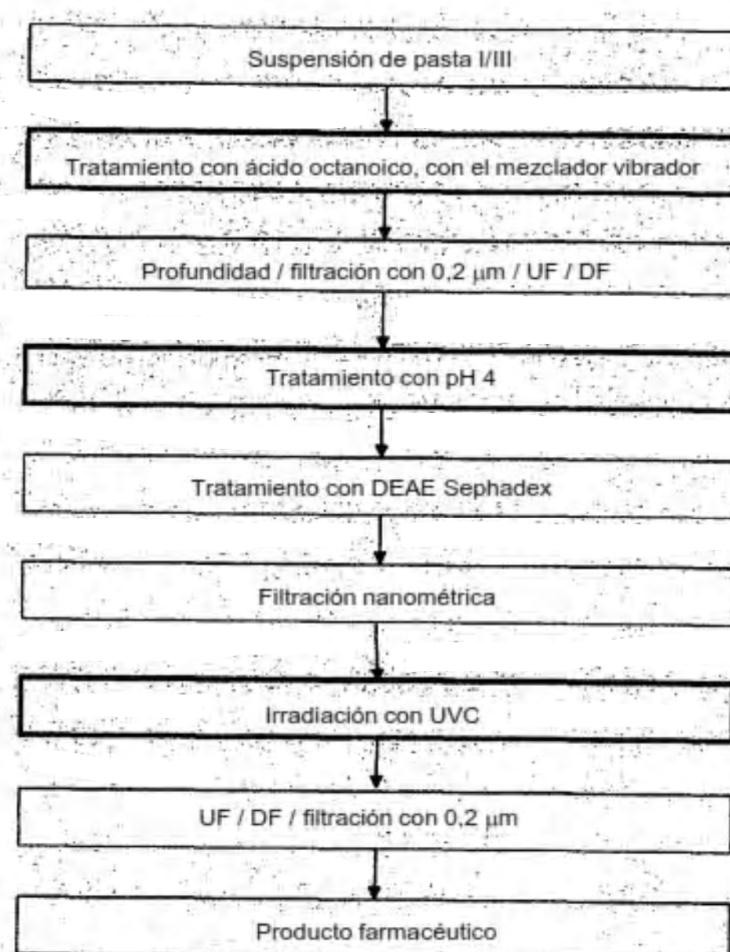
9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, donde:

- (i) el proceso comprende además una etapa de llenar un recipiente con la solución irradiada con UVC de la reivindicación 7 o la preparación de anticuerpos de la reivindicación 8 en condiciones estériles; y/o  
 (ii) la solución irradiada con UVC de la reivindicación 7 o la preparación de anticuerpos de la reivindicación 8 tiene una actividad proteolítica de menos de 8U/l; y/o  
 (iii) el proceso proporciona una eliminación mayor de 3 log<sub>10</sub> de virus sin envoltura.

10. Una preparación de anticuerpos que comprende inmunoglobulinas que se pueden obtener preferentemente mediante el proceso de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, donde preferentemente al menos un 15 % de las inmunoglobulinas totales son IgM.

11. Una preparación de anticuerpos que comprende inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM, donde al menos un 15 % de las inmunoglobulinas totales son IgM, donde la preparación de anticuerpos es segura contra virus con respecto a los virus con envoltura y sin envoltura, tiene una actividad anticomplementaria de ≤ 1 CH 50/mg de proteína, y es estable en forma líquida durante al menos 6 meses cuando se almacena de 2 a 8 °C.

12. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 11, que tiene una actividad proteolítica inferior a 8 U/l.
13. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde:
- 5 (i) la preparación comprende al menos 20 % de IgM y preferentemente de 20 % a 30 % de IgM; y/o  
(ii) la preparación comprende además un agente estabilizante, preferentemente donde el agente estabilizante es glicina; y/o  
10 (iii) donde la preparación es estable durante al menos 2 años cuando se almacena de 2 a 8 °C; y/o  
(iv) donde las inmunoglobulinas no están químicamente modificadas, o donde la preparación no se ha tratado durante su proceso con  $\beta$ -propiolactona o con una proteasa añadida, tal como pepsina.
14. Una composición de inmunoglobulina que contiene IgM que se puede obtener mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 15. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 para su uso en medicina.
- 20 16. Una preparación de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de trastornos inmunes o de infecciones bacterianas, preferentemente donde el trastorno inmune es un trastorno por deficiencia en IgM.
- 25 17. Uso de una preparación de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de trastornos inmunológicos e infecciones bacterianas.



**FIGURA 1**